

Untersuchungen an Plasmiden
aus
Methylobacterium clara

Thomas Metzler

Disbui. München

1988

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen an Plasmiden aus *Methylomonas clara*

von

Thomas Metzler

aus

Ingolstadt

1988

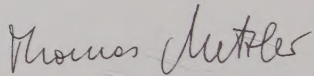
Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 12 (3) der Promotionsordnung vom 5.3.1981 von Prof. Dr. E.-L. Winnacker betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 20.6.1988



Thomas Metzler

Dissertation eingereicht am 20.6.1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Fanning

Tag der mündlichen Prüfung: 25.7.1988

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1984 bis Juli 1988 unter Anleitung von Herrn Prof. E.-L. Winnacker am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgeführt.

Herrn Prof. Winnacker danke ich besonders für die Überlassung des Themas, für die Möglichkeit zur Eigeninitiative, sowie für sein Interesse und die Unterstützung während dieser Arbeit.

Herrn Dr. R. Marquardt, Frankfurt, Hoechst AG, möchte ich recht herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit und für viele wertvolle Diskussionen danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. E. Lanka, MPI Berlin, für seine Ratschläge und die Überlassung zahlreicher Bakterienstämme und Plasmide.

Herrn Dr. R. Mertz und Frau Sabine Stelzig, Genzentrum München, danke ich für die Synthese von Oligonukleotiden.

Herrn Dr. P. Heinrich danke ich für die Einführung in die Technik des doppelsträngigen Plasmidsequenzierens.

Ich danke Herrn Dr. M. Lipp für sein Engagement in unserem Arbeitskreis, Herrn Dr. Greull für die Organisation des Isotopenlabors und Herrn Dr. Ibelgaufs für die Korrektur englischer Manuskripte und seine Hilfe am Schreibcomputer.

Herzlich danken möchte ich Frau J. Stiebler und Herrn H. Brunner, die mich im Rahmen ihres "Fortgeschrittenen-Praktikums" unterstützen.

Bei Frau K. Thalmeier bedanke ich mich für die spannende Zusammenarbeit am Computer, bei Frau Dr. I. Gander für viele entspannende Billardspiele.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden aus dem anorganischen und organischen Institut, die mich in vielfacher Hinsicht zu Ruhe und Gelassenheit bestärkten.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des biochemischen Instituts bedanken, die durch die gute Atmosphäre, ihre Freundschaft und durch viele Anregungen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Methylotrophie	1
1.2 Plasmide	4
1.3. Aufgabenstellung	11
2. Materialien	12
2.1 Bakterien und Plasmide	12
2.2 Enzyme und Chemikalien	13
2.4 Puffer, Medien und Lösungen	15
3. Methoden	18
3.1 Bakterienkulturen	18
3.1.1 Vermehrung auf Agarplatten	18
3.1.2 Antibiotikumagar	18
3.1.3 Einzelkoloniereinigung	19
3.1.4 Vermehrung in Flüssigkultur	19
3.1.5 Stammhaltung	19
3.2. Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien	20
3.2.1 Plasmidisolierung durch Dichtegradienten-Zentrifugation	20
3.2.2 Plasmid-Schnellpräparation	22
3.2.3 Isolierung chromosomaler DNA	23
3.2.4 Isolierung von RNA	23
3.2.5 Reinigung von Oligonukleotiden	25
3.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose	27
3.2.7 Konzentrierung von DNA und RNA und Inaktivierung kontaminierender Proteine	28
3.3 Analyse von DNA und RNA	29
3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	29
3.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30

	Seite
3.3.3	Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese 30
3.3.4	TCA-Fällung von DNA und RNA und Szintillationszählung 31
3.3.5	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA 31
3.3.6	Kartierung des 5'-Endes von mRNA 32
3.4	Verfahren zur Auffindung spezifischer RNA und DNA 34
3.4.1	Southern-Transfer 34
3.4.2	Northern-Transfer 35
3.4.3	Hybridisierung von DNA und RNA 35
3.4.4	Koloniehybridisierung 36
3.4.5	Autoradiographie 37
3.5	Enzymatische Modifikationen an DNA und RNA 37
3.5.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen 37
3.5.2	Abspaltung von 5'-Phosphaten durch alkalische Phosphatase 38
3.5.3	Auffüllen von überhängenden 5'-Enden mit Klenow-Polymerase 38
3.5.4	³² P-Markierung von 5'-Enden mit T4-Polynukleotid-Kinase 38
3.5.5	<i>In vitro</i> Markierung von DNA mit α - ³² P-dCTP 39
3.5.6	Kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase 40
3.5.7	³² P-Markierung von RNA 41
3.6	Klonierung von DNA-Fragmenten in <i>E. coli</i> 41
3.6.1	Herstellung transformationskompetenter Bakterien 41
3.6.2	Transformation der Bakterien 42
3.7	DNA-Sequenzierung an doppelsträngiger Plasmid-DNA (Sanger-Verfahren) 42
3.7.1	Sequenzierung mit Klenow-Polymerase 42
3.7.2	Sequenzierung mit "Sequenase™" 44
3.7.3	Sequenzgele 43
3.8.	Nachweis von IL-2 durch Western Blot Analyse 46
3.8.1	Lysis der Bakterien und SDS-Gelelektrophorese 47
3.8.2	Western Blot und Antikörper-Reaktion 47

	Seite
4. Ergebnisse	48
4.1 Identifizierung transkriptionsaktiver Bereiche der Plasmide pBE-3 und pBE-2	48
4.1.1 Kartierung der Transkriptionsaktivität von pBE-3 und pBE-2 in <i>M. clara</i>	48
- Transkription des Plasmids pBE-3	48
- Transkription des Plasmids pBE-2	51
- Kontrollexperimente	53
4.1.2 Transkriptionsaktivität der Plasmide in <i>E. coli</i>	55
4.1.3 Untersuchung des Stammes <i>M. clara</i> BE-1 auf plasmid-spezifische Transkription	56
4.2 Charakterisierung des hochtranskribierten Bereiches (Fragment E3)	57
4.2.1 Transkriptionskartierung des Fragments E3	57
4.2.2 Sequenzierung des Promotorbereichs	59
4.3 Analyse des Promotorbereichs	62
4.3.1 Vergleich der Aktivität beider Promotoren	62
4.3.2 Vergleich der Struktur beider Promotoren und Homologie zu <i>E. coli</i> Promotoren	63
4.3.3 Bestimmung des Transkriptionsstarts auf Fragment E3	64
- S1 Mapping	64
- Primer Extension	66
4.3.4 Mögliche Sekundärstruktur und energetische Berechnung	68
4.4 Expression von IL-2 in <i>M. clara</i> unter Verwendung des Promotors pL	70
4.4.1 Klonierung des Expressionsvektors pTM-IL-2	70
4.4.2 Nachweis der IL-2 Expression	75
4.5 Klonierung eines β -Galaktosidase-Expressionsvektors unter Verwendung des Promotors pL	76

	Seite
4.6 Bestimmung der DNA-Sequenz des hochtranskribierten Bereichs (Fragment E3)	78
4.6.1 Subklonierung von Fragment E3	78
4.6.2 Sequenzierung von Fragment E3	80
4.6.3 Struktur des Terminators und der nachfolgenden Promotoren	86
- Terminator	86
- Promotoren pL* und pR*	88
4.7 Charakterisierung des plasmidhomologen Bereichs im Genom des Stammes <i>M. clara</i> BE-1	91
4.7.1 Analyse der Cosmidklone pTM5/87 und pTM1/56	92
4.7.2 Bestimmung des homologen bzw. integrierten Anteils von pBE-2	95
4.7.3 Teilweise Zuordnung der integrierten Fragmente	97
4.8 Charakterisierung des zum hochtranskribierten Fragment E3 homologen Bereichs im Genom von BE-1	99
4.8.1 Identifizierung von E3i	99
4.8.2 Subklonierung des Fragments E3i	99
4.8.3 Charakterisierung des Fragments E3i	101
4.9 Untersuchung der Plasmide pBE-2 bzw. pBE-3 auf Homologien zur chromosomalen DNA aus <i>E. coli</i>	103
4.10 Ermittlung biologischer Funktionen von pBE-2 bzw. pBE-3 durch Homologievergleiche	104
4.10.1 Homologie von pBE-2 zu Plasmiden mit breitem Wirtsbereich	105
4.10.2 Homologie von pBE-2 zu R751	105
- Homologie auf R751	105
- Homologie auf pBE-2	109
4.10.3 Homologie von pBE-2 zu R538	111
4.10.4 Homologie von pBE-2 zu N3	112
4.10.5 Homologie von PBE-2 zu R906	113

	Seite
5. Diskussion	115
5.1 Transkription der Plasmide in <i>M. clara</i> und <i>E. coli</i>	115
5.2 Transkriptionselemente in <i>M. clara</i> und mögliche Regulationsmechanismen	117
5.3 <i>M. clara</i> als mögliches Expressionssystem	127
5.4 Homologie des Plasmids pBE-2 zum Genom von BE-1 und zu anderen Plasmiden	131
6. Zusammenfassung	133
7. Anhang	134
7.1 Plasmid pRMt25b	134
7.2 Sequenz des IL-2 Expressionsvektors pTM-IL-2	134
7.3 Schnittstellen für Restriktionsenzyme auf Fragment E3 (pBE-3)	136
8. Literaturverzeichnis	147



Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g/l	Gramm pro Liter
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	Piperazin-N-N'-bis(2-ethansulfonsäure)
Pos.	Position
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen

1. EINLEITUNG

1.1 Methyлотrophie

Zu einer der erstaunlichsten bakteriellen Stoffwechselleistungen gehört die Fähigkeit bestimmter Bakterienstämme, ihre gesamten kohlenstoffhaltigen Moleküle aus C_1 Verbindungen aufzubauen, die nicht CO_2 sind, sondern einen reduzierteren Zustand (z.B. CH_3OH) darstellen. Dieses Phänomen wird als Methyлотrophie bezeichnet und wurde erstmals bereits im Jahre 1905 beschrieben (Söhngen et al., 1905). Hierbei handelte es sich um einen zunächst als *Bacillus methanicus*, später als *Methylomonas methanica* (Foster & Davis, 1966) bezeichneten, Methan verwertenden Organismus.

Methyлотrophe bzw. methanotrophe Bakterien sind äußerst weit verbreitet. Etwa 50% des gesamten Kohlenstoffs der Biosphäre wird anaerob unter anderem durch bestimmte Archaeobakterien, sog. methanogene Bakterien in Methan verwandelt (Zeikus, 1985; Thauer, 1985). Jedoch erreicht nur ein verschwindend geringer Anteil die Atmosphäre, da der überwiegende Teil durch methano- und methyлотrophe Organismen zu CO_2 oxidiert wird (Whittenbury et al., 1976). In jüngster Zeit wurde beispielsweise eine Symbiose von methyлотrophen Bakterien mit Tiefseemuscheln entdeckt (Cavanaugh et al., 1987). Methyлотrophe Bakterien stellen eine der größten Gruppen von Mikroorganismen dar, und ihre Stoffwechselleistungen tragen wesentlich zur Aufrechterhaltung der Atmosphäre bei (Higgins et al., 1981).

Trotz ihrer frühen Entdeckung, ihrer weiten Verbreitung und ihrer enormen Bedeutung für die Atmosphäre, erfolgten genauere Untersuchungen von methyлотrophen Bakterien erst in den 70er Jahren, als von Whittenbury über hundert verschiedene obligat methyлотrophe Stämme isoliert und charakterisiert wurden (Whittenbury et al., 1970).

Zu den von methyлотrophen Bakterien als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwendeten Substraten zählen Methan, Methanol, Formaldehyd, Methylamine und Dimethylether. Der Hauptstoffwechselweg verläuft hierbei im Falle sog. methanotropher Bakterien von Methan über Methanol - bzw. ausgehend von der jeweils genutzten C_1 Quelle - zu Formaldehyd, Ameisensäure und CO_2 . Voraussetzung für die Verwertung des jeweiligen C_1 Substrates ist die Existenz einer spezifischen Dehydrogenase. Eine Reihe methyлотropher Stämme besitzt außer der zur

Methanolverwertung essentiellen Methanoldehydrogenase (MDH) noch eine Reihe von Dehydrogenasen für sekundäre Alkohole. Daraus resultiert die als Biotransformation bezeichnete Fähigkeit zur Umwandlung von verschiedenen organischen Verbindungen in teilweise technisch bedeutende Produkte wie beispielsweise Propylenoxide (Haber et al., 1983).

Der Aufbau höherer Kohlenstoffverbindungen für Zellgerüst und Zellstoffwechsel erfolgt bei methylotrophen Bakterien von der Stufe des Formaldehyd aus und kann über zwei verschiedene Stoffwechselwege verlaufen, den Ribulosemonophosphat- und den Serinweg, wobei ersterer für die Zelle energetisch günstiger ist. In diesem Zusammenhang sei auf die hervorragende Zusammenstellung der Biochemie methylotropher Bakterien von Ching T. Hou (1984) verwiesen.

Alle bisher untersuchten methylotrophen Bakterien sind obligat aerob (Quayle & Ferenci, 1978). Die meisten Stämme sind auch obligat methylotroph, können also im Gegensatz zu sog. fakultativ methylotrophen keine Stoffe mit Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen verwerten, was möglicherweise auf die Abwesenheit einer funktionsfähigen α -Ketoglutaratdehydrogenase zurückzuführen ist (Davey et al., 1972).

Die Einteilung obligat methylotropher Bakterien erfolgt einerseits nach oben genannten Stoffwechselwegen (Ribulosemonophosphatweg: TypI; Serinweg: TypII) und andererseits nach der Struktur intracytoplasmatischer Membranen. Anhand weiterer Kriterien zerfallen diese beiden Hauptgruppen dann in zahlreiche Untergruppen (Colby et al., 1979).

Das ebenso von molekularbiologischer wie industrieller Seite interessante Phänomen der Methylotrophie war im letzten Jahrzehnt mit dem Aufkommen einer neuen Technologie, der sog. Gentechnik, Gegenstand vielfacher Untersuchung. Da jedoch bei obligat methylotrophen Stämmen keine konditional lethalen Mutanten mit Defekt im Stoffwechselweg der Methylotrophie erzeugt werden konnten (Moore et al., 1983), blieben deren Gene lange Zeit unbekannt. Erst in den letzten Jahren konnten bei fakultativ methylotrophen Stämmen durch Komplementationsanalysen mittels Cosmidvektoren mit breitem Wirtsbereich (Allon & Hanson, 1985) und der Verwendung von Allylalkohol als Suizidsubstrat (Nunn & Lidstrom, 1986a) elf zur C1 Oxidation bzw. zur Methanolverwertung essentielle Gene identifiziert und das Gen für das Schlüsselenzym, die MDH, kloniert werden (Nunn & Lidstrom, 1986b; Machlin et al., 1988).

Fast alle obligat methylotrophen Stämme besitzen Plasmide unterschiedlicher Größe (Monteiro et al., 1982; Hou, 1984). Im Gegensatz zur allmählichen Aufklärung der Strukturgene für methylotrophes Wachstum blieben die biologischen Funktionen der Plasmide bei allen obligat methylotrophen Stämmen bislang unbekannt (Haber et al., 1983; Lidström & Wopat, 1984). Doch sind gerade Plasmide - dies soll im nächsten Abschnitt näher erläutert werden - sowohl in der Gentechnologie und Molekularbiologie als auch zur industriellen Nutzung mikrobieller Organismen von großer Bedeutung.

Die überwiegende Anzahl an genetischen und gentechnologischen Experimenten wurde bisher an *E. coli* Stämmen durchgeführt, welche sich einerseits durch leichte Handhabung auszeichnen, andererseits aber hohe Ansprüche an das Nährmedium stellen.

Für biotechnologische Prozesse industriellen Ausmaßes gewinnen jedoch Organismen, welche leicht und billig fermentierbar sind, immer größere Bedeutung. Hierbei spielen neben den in vieler Hinsicht wichtigen Streptomyceten (Hopwood et al., 1985; Martin & Gil, 1984) auch eine Reihe methylotropher Stämme eine entscheidende Rolle, da Methanol eine preisgünstige und in großtechnischem Maßstab verfügbare Kohlenstoffquelle darstellt. Methylotrophe Bakterien sind auch zur Erzeugung von Biomasse, sog. "single-cell protein" (SCP) und somit zur Gewinnung von Eiweiß als Nahrungsmittel- und Tierfutterzusatz geeignet. Bei dem obligat methylotrophen Stamm *Methylophilus methylotrophus* (Byrom, 1981) konnte beispielsweise die Verwertung von Methanol und damit die Effizienz der SCP-Produktion um etwa 5% gesteigert werden, indem eine Glutamatsynthese-Mutante durch das Glutamatdehydrogenase Gen aus *E. coli* komplementiert wurde (Windass et al., 1980).

Aufgrund marktwirtschaftlicher Gesichtspunkte verlagerte sich jedoch das Interesse in den letzten Jahren auf die Expression von Fremdprotein in methylotrophen Organismen. Die Vorteile methylotropher Stämmen liegen hierbei einerseits in der schon erwähnten billigen Fermentierbarkeit, andererseits aber auch in der gegenüber *E. coli* Stämmen nochmals erhöhten biologischen Sicherheit, da obligat methylotrophe Stämme nur in methanolhaltigem Medium lebensfähig sind und deren Plasmide nicht in *E. coli* Stämmen replizieren können (Marquardt & Winnacker, 1984). Gerade bei der derzeit geringen gesellschaftlichen Akzeptanz der Biotechnologie scheint dieser Vorteil obligat methylotropher Bakterien von großer Bedeutung.

Ein Organismus, welcher die erwähnten Bedingungen erfüllt (obligat methylotroph, leicht fermentierbar) und sowohl zur Erzeugung von Biomasse (SCP) als auch eventuell zur Produktion von Fremdprotein geeignet ist, wurde in den 70er Jahren gefunden (Präve et al., 1975; Faust et al., 1977). Nach näherer Charakterisierung durch Hohenloser et al. (1978) wurde der Bakterienstamm gemäß "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" in die Gattung *Methylomonas* eingestuft. Der Stamm, welcher die Bezeichnung *Methylomonas clara* erhielt (ATCC 31226), gehört nach Whittenbury et al. (1970) in die Gruppe I der obligat methylotrophen Bakterien. Neben dem Stamm *M. clara* wurden noch drei weitere, eng verwandte Stämme isoliert, welche die Bezeichnung B45-BE-1, B45-BE-2 und B45-BE-3 erhielten und bereits von Marquardt (1983) näher untersucht wurden.

Während die Stämme *M. clara* B45-BE-3 und BE-2 Plasmide von 16 bzw. 46 kb enthalten (Stahl & Esser, 1982; Marquardt & Winnacker, 1984), enthält der Stamm BE-1 kein freies Plasmid, sondern plasmidhomologe Sequenzen im Genom.

1.2. Plasmide

Als Anfang der 50er Jahre der Austausch genetischer Information bei Bakterien näher untersucht wurde (Lederberg et al., 1952; Hayes, 1953), stellte sich heraus, daß bestimmte Stämme außer ihrem zentralen Genom extrachromosomale genetische Elemente enthielten, welche auf andere Bakterien übertragbar waren. Während dieses als Konjugation bezeichneten Vorgangs wird ein kleines ringförmiges DNA-Molekül gezielt von der Spender- auf die Empfängerzelle übertragen. Dieses extrachromosomale DNA Molekül wurde als F-Faktor bezeichnet und macht etwa 2% des gesamten Genoms aus.

Der Entdeckung der F-Faktoren folgte die Isolierung sog. Resistenzfaktoren, ebenfalls kleine zirkuläre DNA Moleküle, die ihrem Wirt Antibiotika- oder Colicinresistenz verleihen (Clowes, 1973). Auf die Existenz dieser extrachromosomalen DNA-Elemente wurde man erstmals 1959 in Japan aufmerksam, wo während einer Ruhrepidemie Bakterienstämme auftraten, die gleichzeitig gegen eine Reihe von Antibiotika resistent waren (Watanabe,

1963). Es konnte daraufhin gezeigt werden, daß diese Resistenzen auf andere Bakterien übertragbar waren (Ochiai et al., 1959; Akiba et al., 1960).

Alle diese extrachromosomalen, meist ringförmig geschlossenen genetischen Elemente können sich aufgrund eines Replikationsursprungs (ori) selbständig, d.h. unabhängig vom zentralen Genom, replizieren und werden unter dem Begriff Plasmide zusammengefaßt.

Sowohl aus medizinischem und genetischem als auch aus industriellem Interesse wurden in den folgenden Jahren eine große Anzahl unterschiedlicher Plasmide aus den verschiedensten Bakterienstämmen isoliert und genetisch charakterisiert. Eine Übersicht über mehrere hundert verschiedener Plasmide findet sich bei Bukhari et al. (1977).

Plasmide wurden jedoch nicht nur in Bakterien, sondern auch in Hefen und sogar in höheren eukaryotischen Zellen gefunden. Zu nennen sind hier beispielsweise das sog. 2 μ oder scp Plasmid aus *Saccharomyces cerevisiae* (Livingston, 1977; Hartley & Donelson, 1980) und das THE-1 Element, welches in einer HeLa-Zelllinie identifiziert wurde (Misra et al., 1987). In jüngster Zeit wurde auch von autonom replizierenden, stabilen Plasmiden in transgenen Mäusen berichtet (Léopold et al., 1987).

Neben den schon erwähnten Konjugations- und Resistenzfunktionen können Plasmide eine Vielzahl weiterer biologischer Funktionen ausüben: Produktion von Enterotoxinen, Bakteriocinen (z.B. Colicin), und Lysisproteinen (Baty et al., 1987) sowie Immunitätsproteinen (Kahn et al., 1979; Helinski et al., 1979), Resistenz gegen Schwermetallionen wie beispielsweise Quecksilber-Resistenz (O'Halloran & Walsh, 1987; Sakanyan, 1986), Produktion von Restriktions- und Modifikationsenzymen sowie DNA Reparaturenzymen (Ando & Arai, 1981) und Synthese von Membranproteinen (Barbour & Garon, 1987). Neben den intensiv untersuchten Ti (tumour inducing) Plasmiden (Nester & Kosuge, 1981) aus *Agrobacterium tumefaciens*, welche Kronengallentumore bei Pflanzen induzieren und in der gentechnologischen Manipulation bei Pflanzen eine große Rolle spielen, gewinnen aufgrund zunehmender Belastung der Umwelt mit organischen Verbindungen die sog. OCT- und TOL-Plasmide aus verschiedenen *Pseudomonas* Arten große Bedeutung. Diese kodieren nämlich für Enzyme, welche in der Lage sind, Alkane und aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen (z.B. Toluolverbindungen) abzubauen (Ramos et al., 1987).

Bei vielen Plasmiden ist aber die biologische Funktion noch völlig unbekannt. Zu diesen sog. kryptischen Plasmiden zählen beispielsweise die meisten Plasmide aus *Bacillus* Stämmen (Kreft & Hughes, 1982) und sämtliche Plasmide aus obligat methylo trophen Stämmen (Haber et al., 1983; Lidstrom & Wopat, 1984).

Seit der ersten Plasmidisolierung durch Marmur et al. (1961) wurden zahlreiche weitere Verfahren entwickelt, um Plasmide je nach Größe und Bakterienstamm in guten Ausbeuten zu isolieren. Grundlage der meisten Verfahren ist eine Ethidiumbromid/CsCl-Dichtegradientenzentrifugation, welche die besondere Struktur der Plasmide ausnutzt. Die meisten Plasmide sind nämlich nicht nur ringförmig geschlossen, sondern zusätzlich stark verdreht, so daß eine gespannte und energiereiche, eine sog. "supercoiled" Form vorliegt, welche weniger Ethidiumbromid zu intercalieren vermag als lineare oder zirkuläre DNA.

Neben den geschilderten, ringförmig geschlossenen Plasmiden wurde auch eine Reihe linearer Plasmide isoliert, wie beispielsweise aus dem Bakterium *Borrelia burgdorferi*, welche kovalent geschlossene Enden aufweisen (Barbour & Garon, 1987) und Plasmide aus Streptomyceten (Kinashi et al., 1987), welche mit einer Länge von 580 kb - also etwa einem zwanzigstel des gesamten Genoms - zu den größten bisher gefundenen extrachromosomalen Elementen zählen. Plasmide dieser Größe können nur durch sog. "pulsed field Gelelektrophorese" von chromosomaler DNA getrennt werden.

Die Klassifizierung von Plasmiden kann einerseits nach sog. Inkompatibilitätsgruppen und andererseits nach Höhe der Kopienzahl bzw. der Fähigkeit zur Konjugation erfolgen.

Die Unterteilung in über 30 verschiedene Inkompatibilitätsgruppen beruht auf der Tatsache, daß verschiedene Plasmide häufig nicht nebeneinander in ein und derselben Bakterienzelle zu existieren vermögen, sondern eines von beiden während des Wachstums eliminiert wird. Solche Plasmide werden als inkompatibel bezeichnet und in einer gemeinsamen Inkompatibilitätsgruppe zusammengefaßt (Datta, 1974; Novick et al., 1976). Sind verschiedene Plasmide hingegen im gleichen Wirt nebeneinander existenzfähig, so werden sie als kompatibel eingestuft und gehören definitionsgemäß verschiedenen Inkompatibilitätsgruppen an.

Inkompatibilität und Kontrolle der Kopienzahl bzw. der Plasmidreplikation scheinen eng miteinander verknüpft (Lacatena & Cesarini, 1981; Cesarini &

Banner, 1985). Im Falle der gut untersuchten ColE1 Plasmide wird die Kontrolle der Replikation hauptsächlich durch zwei plasmidkodierte RNA Moleküle mit gegensinniger Orientierung ausgeübt (antisense), von denen das eine (RNAII) nach Prozessierung durch RNaseH als Primer für die DNA Synthese dient. Beide RNA Moleküle vermögen über Basenkomplementarität und tRNA ähnliche Strukturen miteinander zu interagieren - ein von Tomizawa mit dem einprägsamen Begriff "kissing interaction" bezeichneter Prozeß (Tomizawa, 1984). Diese Wechselwirkung entscheidet über die Verfügbarkeit von RNAII als Primer und kontrolliert somit die Replikation und die Kopienzahl der Plasmide. Gleichzeitig kann bei Ähnlichkeit von RNAI zweier verschiedener Plasmide eines von beiden eliminiert werden (Inkompatibilität). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, daß die Geschwindigkeit der Interaktion beider RNA Moleküle wesentlich durch die Bindung des Rop-Proteins an die "stem-loop" Strukturen beeinflusst wird (Helmer-Citterich, 1988). Auch im Fall der Replikation des *E. coli* F-Plasmids spielen eine Reihe DNA bindender Proteine eine wichtige Rolle: DnaA-Protein (Hanson & Yarmolinsky, 1986), E-Protein (Masson & Ray, 1986) und C-Protein (Caughey & Lane, 1986). Bei der Replikation des Plasmids pSC101 konnte der sog. "Integration host Factor" (IHF) als essentiell nachgewiesen werden (Stenzel et al., 1987). Neben dem hier geschilderten Mechanismus treten jedoch zahlreiche Varianten auf, insbesondere ist hier der bei Plasmid pC194 aus gram positiven Bakterien auftretende "Rolling circle" Mechanismus zu nennen (Gros et al., 1987).

Zur gleichmäßigen Verteilung der Plasmide auf die Tochterzellen sind häufig spezielle Segregations- und Partitionsmechanismen (Par-Region) vorhanden (Nordström et al, 1980), welche im Detail am 2 μ Plasmid aus Hefe untersucht sind (Som et al., 1988).

Da pro Bakterienzelle eine bestimmte Anzahl an Plasmiden vorliegt, kann die Klassifizierung auch nach der Kopienzahl erfolgen. Der Gruppe mit geringer Kopienzahl gehören relativ große Plasmide an, die meist die schon erwähnte Fähigkeit zur Konjugation besitzen, bezüglich ihrer Replikation eng an die des Wirtschromosoms gekoppelt sind ("stringent control") und für ihre Vermehrung keine DNA-PolymeraseI, jedoch aktive Proteinbiosynthese benötigen.

In die Gruppe mit hoher Kopienzahl gehören die meisten kleineren Plasmide, welche unabhängig vom Wirtschromosom replizieren ("relaxed control") und

sich bei Chloramphenicol-Behandlung der Bakterienzelle weiter vermehren, während die Replikation des Wirtschromosoms aufgrund der inhibierten Proteinsynthese stoppt (Clewell, 1972). Plasmide dieser Gruppe benötigen zur Replikation meist DNA-PolymeraseI, jedoch scheint die Abhängigkeit weniger strikt zu sein als bisher angenommen, da im Falle von ColE1 Plasmiden auch eine Vermehrung ohne DNA-PolymeraseI beobachtet wurde (Masukata et al, 1987). Die zu dieser Gruppe gehörenden Plasmide sind in der Regel nicht konjugativ.

Voraussetzung für das Zustandekommen einer Konjugation sind die sog. Transfer (tra)- und Mobilisierungs (mob)-Funktionen, welche durch Gene des Plasmids kodiert werden und die Größe von konjugativen Plasmiden bedingen. Durch Anwesenheit eines konjugativen Plasmids, welches die entsprechenden Transfer- und Mobilisierungsfunktionen enthält, wird bei nicht konjugativen Plasmiden eine Übertragung von Donor- auf Rezipientenzellen ermöglicht, falls das nicht konjugative Plasmid noch über mindestens eine mob-Funktion in cis, nämlich den sog. *nic/bom*-Bereich verfügt. Dieses Phänomen wird als Mobilisierung bezeichnet und hat für die Gentechnologie große Bedeutung: Einerseits muß die Mobilisierbarkeit von Plasmiden, die als Vektoren dienen, völlig ausgeschaltet werden, um bei bestimmten Klonierungen - beispielsweise von DNA Sequenzen mit pathogenen Eigenschaften - die erforderliche biologische Sicherheit zu gewährleisten (EK2 Vektoren). Eine möglichst umfassende Kenntnis über die als Vektoren verwendeten Plasmide eines zur Expression von Fremdprotein verwendeten Bakterienstammes scheint auch unter diesem Aspekt eine notwendige Voraussetzung.

Konjugation und Mobilisierung können jedoch andererseits auch ausgenützt werden, um in bestimmte Bakterienstämme wie z.B. Rhizobien, Pseudomonaden und methylo trope Stämme "Fremd-DNA" einzuschleusen (Ausubel et al., 1982), bei welchen andere Verfahren wie Transformation und Phageninfektion größtenteils versagen.

Ein weiteres Charakteristikum von natürlich vorkommenden Plasmiden ist ihre Wirtsspezifität. Die meisten Plasmide vermögen nur in bestimmten Organismen zu existieren und gehen bei Einführung in einen für sie fremden Wirtsorganismus verloren. Eine Ausnahme hiervon bilden Plasmide der Inkompatibilitätsgruppe P, welche "breiten Wirtsbereich" aufweisen und sich

in allen bisher getesteten gram-negativen Bakterien vermehren können (Ditta et al., 1980).

Neben dem geschilderten Phänomen der Konjugation gibt es eine weitere Möglichkeit des Austausches von Antibiotika-Resistenzen (Kleckner, 1981) und anderer genetischer Information. Auf vielen Plasmiden wurden nämlich mobile genetische Elemente, sog. Transposons gefunden. Diese im Genom eines Organismus "springenden DNA-Sequenzen" wurden erstmals in den 40er Jahren von Barbara Mc. Clintock bei Maispflanzen entdeckt und werden heute auf molekularer Ebene eingehend untersucht (Shapiro, 1983; Grindley & Reed, 1985). Transposons kodieren für Antibiotika-Resistenzen und Proteine (Transposase, Resolvase), welche die Integration an den verschiedensten Stellen im Genom ermöglichen. Ein weiteres, für die Transposition meist unerlässliches strukturelles Merkmal sind identische, in gegensätzlichen Orientierungen verlaufende Nukleotidsequenzen an den Enden (IS-Elemente). Während die vom Transposon kodierten Proteine in trans zur Verfügung gestellt werden können, müssen die umgekehrten Repetitionen in cis vorliegen (Gamas et al., 1985; Huang et al., 1986). Häufig ist die Integration ins bakterielle Genom mit einer Duplizierung der Target-Sequenzen verbunden (Iida et al., 1983; Iida & Hiestand-Nauer, 1986), jedoch sind auch Ausnahmen bekannt, beispielsweise erzeugt das Transposon Tn554 keine Duplikationen und enthält auch keine terminalen Repetitionen (Murphy et al., 1985). Die meisten Transposons vermögen offensichtlich an jeder beliebigen Stelle ins Genom der Wirtszelle zu integrieren. Doch sind auch Transposons bekannt (z.B. Tn7; Tn554), welche bevorzugte, spezifische Integrationsstellen besitzen, wobei die Auswahl der Integrationsstelle (spezifisch oder unspezifisch) durch transposonkodierte Proteine erfolgt (Waddell & Craig, 1988). Trotz intensiver Untersuchung sind die Mechanismen der Integration im Detail nicht restlos aufgeklärt. Offensichtlich spielen auch Proteine der Wirtszelle eine Rolle. So konnte eine Bindung des für die Integration vieler Phagen wichtigen "Integration host factor" (IHF) an das IS1 Element nachgewiesen und eine dadurch bedingte strukturelle Veränderung der DNA ("bending") gezeigt werden (Gamas et al., 1985; Prentki et al., 1987).

Die Integration großer Plasmidanteile in das Genom von Wirtszellen wird auch bei den schon erwähnten Kronengallentumoren von Pflanzen gefunden. Transfer und Integration wird hierbei durch die T-DNA des Ti-Plasmids (Alt-Morbe et al., 1986), insbesondere durch die sog. "overdrive"-Sequenz

vermittelt (Peralta et al., 1986). Transposable Elemente treten auch bei Eukaryoten (Hefe, *Drosophila* etc.) auf, doch soll hier auf die teilweise gut untersuchten Mechanismen nicht näher eingegangen werden.

Als Anfang der 70er Jahre nach Entdeckung der Restriktionsendonukleasen (Arber & Linn, 1968) das Gebiet der rekombinanten DNA Techniken zu entstehen begann, war eine wesentliche Voraussetzung für die schnelle Entwicklung der sog. Gentechnologie die Existenz zahlreicher, genetisch bereits charakterisierter Plasmide, welche die Grundlage für die Konstruktion von Vektoren darstellte. Aus der Vielzahl von Vektoren, die bis heute zu den verschiedensten Zwecken konstruiert wurden (vergleiche hierzu Winnacker, 1987), sollen hier nur die zur Erzeugung von Fremdprotein in Bakterien verwendeten Vektoren erwähnt werden. Grundlage dieser sog. Expressionsvektoren ist die Kenntnis der zur Transkription und Translation nötigen Elemente. Über 160 verschiedene Erkennungsstellen für RNA-Polymerasen (Promotoren) wurden bisher im Detail analysiert (Hawley & Mc Clure, 1983). Der etwa 80 Basen lange Sequenzabschnitt weist meist vier charakteristische Regionen mit je zum Teil hochkonservierten Nukleotiden auf, welche in sog. "Boxen" zusammengefaßt werden (Schaller et al., 1975; Pribnow et al., 1975). Auch die zur Translation essentiellen DNA-Sequenzen, welche mit dem 3'-Ende der ribosomalen 16S RNA wechselwirken, sind im *E. coli* System gut untersucht (Shine & Dalgarno, 1975; Gold et al., 1981). Aufgrund einer Analyse von mehr als 120 solcher Translationssequenzen konnten auch hier Konsensussequenzen formuliert werden (Stormo et al., 1982).

Seit der erstmaligen Expression eines menschlichen Gens, des humanen Somatostatin-Gens in *E. coli* (Itakura et al., 1977) wurden zahlreiche Expressionsvektoren mit verschiedenen Promotoren konstruiert, darunter auch Hybridpromotoren wie der in *E. coli* sehr aktive und häufig verwendete tac-Promotor (Amann et al., 1983). Obwohl viele eukaryotische und prokaryotische Proteine erfolgreich in *E. coli* exprimiert wurden, treten doch vielfache Probleme auf wie Unlöslichkeit (Einschlußkörper), geringe Stabilität (Guarente, 1980) bzw. proteolytischer Abbau des gewünschten Proteins (Goff & Goldberg, 1985) oder Instabilität der Vektoren.

Weitere Probleme ergeben sich bei großtechnischer Fermentation von *E. coli* Stämmen, die hohe Ansprüche an das Nährmedium stellen und bei Produktion in industriellem Ausmaß zu einem entscheidenden Kostenfaktor werden.

Die überwiegende Anzahl der Kenntnisse über bakterielle Transkription und Translation wurde bis heute aus *E. coli* Stämmen gewonnen. Sowohl aus molekularbiologisch wissenschaftlicher Sicht als auch aus industriellem Interesse erscheint es aber erforderlich, auch andere Bakterienstämme und Wirtssysteme zu untersuchen, die gewonnenen Erkenntnisse mit bekannten Mechanismen in *E. coli* zu vergleichen und eventuell zur großtechnischen Produktion geeignete Expressionssysteme zu etablieren. Hierzu schien der unter 1.1 beschriebene, obligat methylorophe Stamm *Methylomonas clara* äußerst geeignet. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit den Stämmen B45-BE-1, BE-2 und BE-3 und deren Plasmiden pBE-2 (46kb) und pBE-3 (16kb) durchgeführt, von denen bereits Restriktionskarten existierten (Marquardt & Winnacker, 1984).

1.3. Aufgabenstellung.

Erstes Ziel dieser Arbeit war es, die Transkripte der kryptischen Plasmide pBE-2 und pBE-3 sowohl in *M. clara* als auch in *E. coli* zu kartieren. Stark transkribierte Bereiche sollten dann näher charakterisiert und eventuell sequenziert werden. Weiteres Ziel dieser Untersuchung war schließlich die Isolierung und Analyse eines möglichst starken Promotors aus den Plasmiden, um einerseits Vergleiche mit *E. coli* Promotoren zu ermöglichen und andererseits die Grundlagen für ein effizientes Expressionssystem in *M. clara* zu schaffen.

Weiterhin sollten die im Genom des plasmidfreien Stammes BE-1 enthaltenen, plasmidhomologen Abschnitte näher untersucht werden. Dies kann zur Entdeckung neuer Transposons führen und zur Aufklärung von im Detail noch nicht verstandenen Umlagerungs- und Rekombinationsprozessen beitragen. Da die Etablierung eines Expressionssystems in *M. clara* im plasmidfreien Stamm BE-1 durchgeführt werden muß, erschienen diese Untersuchungen auch im Hinblick auf mögliche Wechselwirkungen der integrierten Plasmidsequenzen mit denen des Vektors von Bedeutung.

Mit der Suche nach anderen, zu pBE-2 und pBE-3 homologen Plasmiden, sollte schließlich ein weiterer Schritt zur Aufklärung der biologischen Funktion der Plasmide aus *M. clara* getan und Verwandtschaftsbeziehungen zu anderen Plasmiden gefunden werden.

2. MATERIAL

2.1 Bakterien und Plasmide

Bakterienstämme:

E. coli HB101: F⁻, hsd20 (r⁻B, m⁻B), supE44, ara-14, galK-2, lacY1, rspL20 (str^R), xyl-5, mtl-1, l-recA13, proA2;

E. coli MC1061: Δ(lacIPOZY)X74,
(Casadaban et al., 1980)

E. coli DH1: F⁻, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r⁻_k, m⁻_k), supE44, relA1;

E. coli JM83: ara, Δ(lac, pro), strA, thi-1, (Φ80dlacZΔM15)
(Veira & Messing, 1982);

M. clara B45-BE-1;
B45-BE-2;
B45-BE-3;

Die *E. coli* Stämme DH1, HB101 und JM83 wurden der Stammsammlung des Arbeitskreises Winnacker entnommen; Der Stamm *E. coli* MC1061 und sämtliche *M. clara* Stämme wurden von Dr. Marquardt, Hoechst AG, zur Verfügung gestellt;

Plasmide:

Folgende Plasmide (bzw. die diese Plasmide enthaltenden *E. coli* HB101 Stämme) wurden von Dr. Lanka, MPI Berlin, erhalten:

RP4; R7k; R6k; R7kTN4; R538-10c; R55; R387; R124; R751; R721; s.-a.; TP114; TP114drp1; ColV2ED56; R621a; N3; R27; RA1; BW66(R144); BW61 (R144ara3); 240a; R112; R391; R906; pJF119EH; pBR329;

Die Plasmide pUC12-IL-2/Pst⁻ und IL-2-tac4 wurden von Dr. Mertz, Genzentrum München, zur Verfügung gestellt.

2.2 Enzyme und Chemikalien

Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Firmen bezogen:

New England Biolabs, Schwalbach;

Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu Isenburg

Boeringer Mannheim GmbH, Mannheim

Weitere Enzyme

Boeringer Mannheim GmbH, Mannheim;

Lysozym; alkalische Phosphatase; DNA-PolymeraseI; Klenow-Polymerase; RNase A; AMV-Reverse-Transkriptase;

New England Biolabs, Schwalbach;

T4 DNA-Ligase; Polynukleotidkinase;

E. Merck AG, Darmstadt;

Proteinase K aus Pilzen

2.3 Chemikalien und andere Materialien

Amersham Buchler GmbH, Braunschweig;

γ -³²P-ATP (3000 Ci/mMol); α -³²P-dCTP (3000 Ci/mMol)

α -³⁵S-dATP (650 Ci/Mol);

Multiprime DNA Labelling System;

J.T. Baker Chemical Co. Philipsburg, New Jersey, USA:

Cäsiumchlorid; Glycerol;

Boeringer Mannheim GmbH, Mannheim;

Adenosin-5'-triphosphat; Chloramphenicol;

Calbiochem GmbH, Frankfurt/Main

Dithiothreitol (DTT);

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:

Bacto-Agar; Bacto-Trypton; Yeast-Extract;

Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm:

Chloroform; Formamid;

Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan:

Röntgenfilme RX

Kodak Limited:

Röntgenfilme XAR5, X-Omat S;

LKB, Gräfelfing

Makrophor Elektrophoresesystem mit Macrodrive 5 Spannungsquelle;

E. Merck AG, Darmstadt:

Ammoniak; Ammoniumperoxodisulfat; Borsäure; Bromphenolblau; n-Butanol;
Calciumcarbonat; Calciumchlorid; Chloroform; Dimethylformamid;
Dimethylsulfoxid; Essigsäure; Ethanol; Ethidiumbromid;
Ethylendiaminessigsäure (EDTA); Formaldehyd; Glucose; Isoamylalkohol;
Isopropanol; Kaliumacetat; Kaliumchlorid; Magnesiumchlorid;
Magnesiumsulfat; Methanol; Natriumacetat; Natriumchlorid; Natriumcitrat;
Natriumdihydrogenphosphat; Natriumdodecylsulfat (SDS); Phenol;
Phosphorsäure; Polyethylenglycol (6000); Salzsäure; Tetramethylethylenamin
(TEMED); Triton-X-100; Trichloressigsäure; Xylencyanol;

Nunc-GmbH, Wiesbaden:

Petrischalen;

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

2'-Desoxyribonukleotid-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP);
2',-3'-Dideoxyribonukleotid-triphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP);
Ficoll 400; Sephadex G50 fine;

C. Roth, Karlsruhe:

Dithiothreitol (DTT).

Schleicher & Schuell, Dassel:

DEAE-Cellulose-Membran, NA-45; Nitrozellulose, BA-85;

Serva, Heidelberg:

Acrylamid; Harnstoff; 2-Mercaptoethanol; N,N'-Methylbisacrylamid;
Polyvinylpyrrolidon (PVP); Visking-Dialysesschläuche;

Sigma Chemie, München:

Agarose TypVII; Nu Sieve Agarose;
Antibiotika: Ampicillin; Kanamycin; Sulfonamid; Streptomycin;
Spectinomycin; Tetracyclin; Trimethoprim;
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid (x-Gal); Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG); γ -(Methacryloxy)-propyltrimethoxysilan;
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS); Rinderserumalbumin; tRNA aus Hefe;
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris).

Whatman Limited, Springfield Mill, Maidstone, Kentucky, USA:

3 MM-Papier; Anionenaustauscher DE-52;

Zinsser, Frankfurt:

Quickszint 501;

2.4 Puffer, Medien und Lösungen

Acetatpuffer 10x:	400 mM Tris/Acetat pH 8,0 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 8,0
Auftragspuffer:	50 mM EDTA pH 8,0 10 mM Tris/Cl pH 8,0 25% Glycerin 1% SDS 0,4% Bromphenolblau

Denaturierungspuffer:	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH	
Guanidiniumisothiocyanat- lösung	50 mM Tris/Cl pH 7, 10 mM EDTA pH 8,0 2% Natriumsarkosylat 1% β -Mercaptoethanol 4 M Guanidiniumisothiocyanat	
Hybridisierungs-Mix:	50% Formamid 50 mM Pipes 5x SSC 0,05% BSA 0,05% Ficoll 400 0,05% PVP	
2x NET-Puffer:	0,3 M NaCl 30 mM Tris/Cl pH 8,3 2 mM EDTA pH 8,0	
Neutralisierungspuffer:	0,5 M Tris/Cl pH 5,5 0,9 M NaCl	
10x Nicktrans- lations-Mix:	700 mM Tris/Cl pH 7,4 100 mM $MgCl_2$ 10 mM DTT 200 μ M dATP 200 μ M dGTP 200 μ M dTTP	
20x SSC:	3 M NaCl 300mM Natriumcitrat	
10x TEB-Puffer:	121 g Tris 51,35 g Borsäure 3,72 g EDTA	H_2O ad 1 l

Triton-X-100- 50 mM Tris/Cl pH 8,0
 Lysis-Mix: 62,5 mM EDTA pH 8,0
 2% Triton-X-100

L-Broth-Medium (LB): 10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefe-Extrakt
 5 g NaCl
 H₂O ad 1 l

Medium M36: 1,5% Methanol
 0,1% H₃PO₄
 0,083% K₂SO₄
 0,018% Na₂SO₄
 0,036% MgSO₄ x 7 H₂O
 0,004% CaCO₃
 0,015% Citronensäure
 0,005% (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ x 6 H₂O
 80 µl/l Spurenelementlösung
 pH 7,2 (mit NH₃)

Spurenelementlösung: 0,05 g H₃BO₃
 0,01 g KJ
 0,04 g MnSO₄ x 4 H₂O
 0,04 g ZnSO₄ x 7 H₂O
 0,02 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄
 H₂O ad 1 l

3. METHODEN

3.1 Bakterienkulturen

3.1.1 Vermehrung auf Agarplatten

Bakterien aus einer Flüssig- oder Glycerinkultur wurden auf Agarplatten ausplattiert bzw. mit einer sterilen Öse ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Für die Vermehrung von *E. coli* wurde L-Broth Vollmedium, für die Vermehrung von *M. clara* M 36 Medium mit jeweils 1,5% Agar verwendet. Dem M36 wurde nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55 °C 1.5% Methanol zugesetzt. Bei dieser Temperatur wurden die Medien in Petrischalen (Nunc Ø 93 mm) gegossen und nach Erstarren bei Raumtemperatur in umgekehrter Position bei 4 °C bis zu 4 Wochen gelagert.

3.1.2 Antibiotikumagar

Je nach Bakterienstamm bzw. Resistenzplasmid wurde dem unter 3.1.1. beschriebenen Agarmedium nach Autoklavieren und Abkühlen auf 60 °C eine steril filtrierte Lösung des entsprechenden Antibiotikums zugesetzt. Die Antibiotika wurden hierbei in folgenden Konzentrationen und Lösungsmitteln eingesetzt:

Antibiotikum	Konzentration(µg/ml)	Lösungsmittel
Ampicillin	50	H ₂ O
Tetracyclin	10	H ₂ O/Ethanol 1:1
Streptomycin	20	H ₂ O
Spectinomycin	25	H ₂ O
Kanamycin	25	H ₂ O
Chloramphenicol	50	Ethanol
Trimethoprim	25	DMF

3.1.3 Einzelkoloniereinigung

Werden mehrere Stämme gleichzeitig in einer Kultur verwendet (z.B. bei Konjugationsexperimenten), ist eine anschließende Einzelkoloniereinigung erforderlich. Hierzu wurden die Bakterien mit einer sterilen Öse derart auf einer Agarplatte ausgestrichen, daß eine fortschreitende Verdünnung resultiert. Nach Vermehrung über Nacht bei 37 °C wurden Einzelkolonien gepickt und erneut auf Agarplatten ausgestrichen. Nach mehrmaligem Wiederholen dieses Vorgangs und gleichzeitiger Verwendung geeigneter Selektionsbedingungen (Antibiotika, Nährmedien) konnte der gewünschte Stamm rein erhalten werden.

3.1.4 Vermehrung in Flüssigkultur

5 ml vorgewärmtes, steriles Medium wurde mit einer Einzelkolonie des entsprechenden Stammes angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Diese sog. Übernachtskultur wurde bei *E. coli* -Stämmen auf 1:200, bei *M. clara* Stämmen 1:20 in frisches Medium verdünnt und bei 37 °C in einer rotierenden Schüttelmaschine bei 150-200 U/min bis zur gewünschten OD₆₀₀ gezüchtet. Für die Züchtung von *M. clara* Stämmen wurden ausschließlich Schikane-Kolben verwendet, um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten.

3.1.5 Stammhaltung

Zur kürzeren Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden mit Parafilm verschlossene Agarplatten in umgekehrter Position bei 4 °C gelagert. Während *E. coli* - Stämme so über mehrere Wochen lebensfähig sind, müssen *M. clara* Stämme spätestens nach 7-10 Tagen auf frische Agarplatten übertragen werden.

Sollten die Zellen für einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden, wurden Übernachtskulturen mit 25-50% Glycerin vermischt und bei -80 °C eingefroren. Bei *M. clara* Stämmen sollte die OD₆₀₀ der einzufrierenden Bakterien-

suspension jedoch nicht über 0,8 liegen, um nach dem Auftauen ein gutes Wachstum zu gewährleisten.

3.2 Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien

3.2.1 Plasmidisolierung durch Dichtegradienten-Zentrifugation

Bakterien mit "stimulierbaren" Plasmiden (Col E1 origin, z.B. pBR322 und Derivate) wurden zur Plasmidisolierung in Suspensionskulturen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 gezüchtet und nach Zugabe von Chloramphenicol (170 µg/ml) über Nacht geschüttelt (maximal 16 h).

Bakterien mit "nicht-stimulierbaren" Plasmiden ("broad host range" Plasmide; *M. clara* Plasmide) wurden in Suspensionskulturen bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 bis 1,5 gezüchtet.

Zur Plasmidisolierung wurden zwei Methoden angewandt:

- "Clear-lysate" - Methode

Methode nach Humphreys et al. (1975), modifiziert nach Marquardt (1983).

Die Bakteriensuspension wurde bei 8000 rpm (Sorvall Rotor GS3) 30 min zentrifugiert und der Bakterienniederschlag in 5 ml kalter Sucroslösung (25% Sucrose in 50 mM Tris/Cl, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml Lysozymlösung (5 mg Lysozym/ml in 250 mM Tris/Cl, pH 8,0) und 2 ml 0,2 M EDTA-Lösung, pH 8,0) wurde 3-5 min auf Eis inkubiert, und unter gelegentlichem Schwenken die Lysis der Bakterien durch Zugabe von 8 ml Triton-X-100 Lysis-Mix herbeigeführt. Die nach einigen Minuten entstehende hochviskose Lösung wurde sofort im vorgekühlten SS34 Rotor bei 20000 rpm für 30 min zentrifugiert. Bei 4 °C wurden nach Abgießen vom Niederschlag zum klaren Lysat X/9 Volumen 5 M NaCl-Lösung und X/9 g an Polyethylenglycol 6000 zugefügt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der sich hierbei bildende flockige Niederschlag wurde nach Zentrifugieren bei 20000 rpm (Sorvall Rotor SS34) in 3,5 ml Puffer (50 mM Tris/Cl, pH 8,0 ; 5 mM EDTA; 50 mM NaCl, pH 8,0) resuspendiert und das Volumen der Lösung bestimmt. Zugabe der gleichen Menge in Gramm an CsCl sowie 1/15 des Volumens an Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml in H₂O) führten meist zur Bildung eines Niederschlags, welcher bei 12000 rpm zentrifugiert (Sorvall

Rotor SS34) und verworfen wurde, während der Überstand einer Gleichgewichtszentrifugation unterworfen wurde (20 h bei 47000 rpm; 18°C; Sorvall Rotor TV 865). Bei Bestrahlen mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm traten deutlich zwei fluoreszierende Banden hervor, die etwa 1 cm auseinanderlagen. Die dickere, untere Bande konnte durch seitliches Anstechen des Röhrchens mit einer Kanüle und Aufziehen der Bande in eine sterile Spritze geerntet werden. Um die noch vorhandenen Verunreinigungen, vor allem die nicht vollständig abgetrennte tRNA, zu entfernen, erfolgte eine zweite Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurden die abgezogenen Plasmidbanden vereinigt, mit CsCl-Lösung (1 mg/ml) aufgefüllt und für 4-6 h bei 60000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die nun einzig vorhandene Plasmidbande wie oben beschrieben geerntet, das Ethidiumbromid durch mehrfaches Ausschütteln mit an CsCl/TE gesättigtem Isopropanol entfernt und die die Plasmid-DNA enthaltende wäßrige Lösung gegen 3x 2 l TE-Puffer für jeweils 2 h bei 4 °C dialysiert.

-Alkalischer Aufschluß

Methode nach Birnboim und Doly (1979)

1 l Bakteriensuspension wurde in der üblichen Weise zentrifugiert und der Niederschlag in 10 ml der folgenden Lösung aufgenommen (Lösung I):

50 mM Glucose
25 mM Tris/Cl, pH 8,0
10 mM EDTA, pH 8,0
5 mg/ml Lysozym

Nach fünfminütigem Stehen bei Raumtemperatur wurden 20 ml einer frisch zubereiteten Lösung der folgenden Zusammensetzung zugegeben (Lösung II):

0,2N NaOH
1% SDS

Nach vorsichtigem Durchmischen erfolgte 10 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 15 ml einer eiskalten 5 M Kaliumacetat-Lösung (pH 4,8) hinzugefügt und erneut 10 min auf Eis stehengelassen. Durch 20 minütige Zentrifugation bei 20000 rpm (Sorvall Rotor SS34, 4 °C) konnten zelluläre DNA und Proteine als Niederschlag abgetrennt werden. Zum klaren

Überstand wurden 0,6 Volumenteile Isopropanol zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 12000 rpm (Sorvall Rotor SS34, Raumtemperatur) wurde das erhaltene Pellet mit 70% Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen und lyophilisiert. Nach Aufnahme in TE erfolgte, wie oben beschrieben, CsCl-Dichtegradientenzentrifugation und Plasmidisolierung.

3.2.2 Plasmid-Schnellpräparation

Zur schnellen Gewinnung kleiner Plasmidmengen (5-10 µg) wurde eine 5 ml Übernachtkultur bei 4 °C in einer Tischzentrifuge (3000 rpm) geerntet, das Pellet in 100 µl Lysozymlösung (5 mg Lysozym / ml; 50 mM Tris/Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0 ;) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl frisch zubereiteter SDS-Lösung (1% SDS; 0,2 M NaOH) und leichtem Schütteln wurde mit 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) versetzt, erneut geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert. 15 minütige Zentrifugation bei 12000 rpm (Sigma Tischzentrifuge, 12000 rpm, 4 °C) ergab ein dichtes Pellet und einen klaren Überstand, der in frische Eppendorfgefäße überführt, mit gleichem Volumen an Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und anschließend mit 2 Volumina absolutem Ethanol gefällt wurde (5 min bei Raumtemperatur). Nach erneuter 15 minütiger Zentrifugation (Eppendorfszentrifuge, Raumtemperatur) wurde der Niederschlag getrocknet, in 100 µl RNase -Puffer (0,1 mg/ml RNase, 10 mM Tris/Cl, pH 8,0 ; 15 mM NaCl) aufgenommen und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Volumen der Lösung mit 40 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 260 µl TE auf 400 µl erhöht und Extraktion mit Phenol/Chloroform und CIA vorgenommen. Nach Zugabe von 2 Volumina absolutem Ethanol wurde 5 min bei -80 °C inkubiert, bei 12000 rpm für 10 min zentrifugiert (Sigma Tischzentrifuge, -20 °C) und das Pellet in 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA lyophilisiert und in 20 µl TE aufgenommen.

3.2.3 Isolierung chromosomaler DNA

Die Isolation von vollständig protein- und RNA freier chromosomaler DNA erfolgte modifiziert nach Marmur (1961).

1 l einer Bakteriensuspensionskultur wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,8 durch 30 minütige Zentrifugation bei 8000 rpm (Sorvall GS3 Rotor, 4 °C) geerntet und anschließend in 50 ml Waschpuffer (150 mM NaCl; 100 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Zugabe von 25 ml Lysozymlösung (2 mg/ml) in obigem Puffer und Inkubation für 1 h bei 37 °C unter gelegentlichem Schütteln. Die hochviskose Lösung wurde mit 5 ml 10% SDS-Lösung versetzt und 10 min im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte Zugabe von Natriumperchlorat bis zur Endkonzentration von 1 M und Extraktion mit CIA. Dann wurde die wäßrige Phase vorsichtig mit 2 Volumina absolutem Ethanol überschichtet und die hierbei ausgefallene DNA durch Drehen einer Pasteurpipette, deren Spitze zuvor mit dem Bunsenbrenner zu einer Öse gebogen wurde, aufgewickelt. Die auf die Öse gewickelte DNA wurde in 70% Ethanol gewaschen und nach Entfernung von überschüssigem Ethanol durch Ausdrücken an der Gefäßwand in 10 ml Puffer (Tris/Cl, pH 8,0 ; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,5% SDS; 0,2 mg/ml Proteinase K) gelöst.

2 stündiger Inkubation bei 37 °C folgten Extraktion mit gleichen Volumina an Phenol, Phenol/Chloroform (1:1) und CIA. Unter Zusatz von Natriumacetat bis zur Endkonzentration von 0,25 M wurde die DNA erneut gefällt, aufgewickelt und in 6 ml 1x SSC-Puffer gelöst, welcher Ribonuklease T₁ (1000 U) und hitzebehandelte Ribonuklease A enthält. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C im Bakterieneschüttler wurde erneut Proteinase K (0,2 mg/ml) zugegeben, wiederum einige Stunden bei 37 °C inkubiert, phenolisiert und mit Ethanol gefällt. Die in 5 ml TE aufgenommene DNA wurde bei 4 °C über Nacht gegen 3x 2 l TE dialysiert und bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.4 Isolierung von RNA

Die Isolierung von intakter Gesamt-RNA erfolgte modifiziert nach Zuber und Losick (1983).

Wie bei der Gewinnung chromosomaler DNA (3.2.4.) wurde 11 Suspensionskultur bei einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 4 °C zentrifugiert und der Bakterien-Niederschlag mit 100 ml Puffer (0,15 M NaCl; 0,1 M EDTA, pH 8,0) gründlich gewaschen, da es ansonsten aufgrund des im Kulturmediums M36 enthaltenen Mohr'schen Salzes zur Bildung des tiefroten Fe(SCN)₃-Komplexes kommt.

Sämtliche Isolierungsschritte wurden bei 4 °C und möglichst schnell ausgeführt, um den Abbau der äußerst labilen mRNA zu verhindern. Aus diesem Grunde erfolgte auch die Resuspension des Bakterienpellets in 10 ml einer Lösung von Guanidiniumisothiocyanat und Mercaptoethanol, welche ein starker Inhibitor von Ribonukleasen ist und wie folgt hergestellt wurde (Maniatis, 1982):

100 g Guanidiniumisothiocyanat wurden mit 100 ml H₂O, 10,6 ml 1 M Tris/Cl (pH 8,0) und 10,6 ml 0,2 M EDTA (pH 8,0)-Lösung versetzt und durch Erhitzen auf 70 °C unter ständigem Rühren in Lösung gebracht. Nach Abkühlen und Zusatz von 21,2 ml Sarkosyllösung sowie 2,1 ml Mercaptoethanol wurde das Gesamtvolumen mit H₂O auf 212 ml gebracht, steril filtriert und die Lösung in einer braunen Glasflasche bei 4 °C aufbewahrt. Da Lysozym in dieser Lösung nicht mehr arbeitet, wurden die resuspendierten Bakterien in einer French-Press aufgeschlossen. Um das Zerplatzen möglichst aller Zellen zu erreichen wurde die French-Press zwei- bis dreimal hintereinander beschickt und bei je 1400 Psi gefahren, wobei Stempel und Stahlgefäß auf 4 °C vorgekühlt waren. Aus dem nun vollständig homogenen Lysat konnte die RNA nach zwei verschiedenen Methoden isoliert werden:

LiCl-Fällung

Mit einem gleichen Volumen einer 4M wäßrigen LiCl-Lösung wurde durch einstündige Inkubation bei 4 °C und anschließender Zentrifugation bei 3000 rpm für 40 min (Tischzentrifuge, 4 °C) die RNA selektiv gefällt. Nach mehrmaligem Phenolisieren wurde die RNA in der üblichen Weise wie DNA mit absolutem Ethanol erneut gefällt und bei -20 °C in 70% Ethanolsuspension aufbewahrt.

CsCl-Gradienten-Reinigung

Zu 2,5 ml Lysat wurden 1 g CsCl hinzugefügt und mit einer CsCl-Guanidiniumisothiocyanat-Lösung (1 g+2,5 ml) auf ein Gesamtvolumen von 10 ml gebracht. Anschließend wurde in Röhrchen für den TST 41.14 Swing-

out-Rotor ein 1,2 ml Kissen (5,7M CsCl, 0,2 M EDTA, pH 8,0;) gegossen, mit obiger Lösung vorsichtig überschichtet, und bei 36000 rpm für 18 h (Ultrazentrifuge, 18 °C) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit einer sterilen, an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette abgesaugt und das glasklare Pellet in 200 µl 10 mM Tris/Cl, pH 8,0 / 5 mM EDTA durch leichtes Erwärmen und Zusatz von 20 µl 10% SDS gelöst. Diese Lösung wurde mit Phenol, Phenol/Chloroform und CIA extrahiert und wie üblich mit Ethanol gefällt.

Obwohl zwischen beiden Methoden kein Unterschied bezüglich Reinheit und evt. Degradierung der RNA zu erkennen war, wurde meist die CsCl-Gradienten-Methode angewendet.

Alle verwendeten wäßrigen Lösungen waren 48 h mit 0,1% Diethylpyrocarbonat-Lösung inkubiert worden, und wurden anschließend mindestens 60 min autoklaviert.

3.2.5 Reinigung von Oligonukleotiden

Die von Dr. Mertz in einem vollautomatischen DNA-Synthesizer (Modell 380 A, Applied Biosystems) nach dem Phosphoramidit-Verfahren hergestellten Oligonukleotide stellen ein Rohgemisch dar und enthalten eine Vielzahl kürzerer Oligonukleotide und Spaltprodukte. Die Aufreinigung der gewünschten Oligonukleotide erfolgte auf einem 16% Polyacrylamid-8M Harnstoffgel von 400 mm Länge und 1,5 mm Dicke bei einer Spurbreite von Zusammensetzung des Gels:

75 g Harnstoff

60 ml Acrylamid (38% Acrylamid; 2% N,N' Methylenebisacrylamid)

15 ml 10x TEB

20 ml H₂O

50 mg Ammoniumperoxodisulfat

30 µl TEMED

Der Ansatz wurde in 40 µl H₂O aufgenommen und ein Aliquot von 1 µl nach einer 1:1000 Verdünnung mit H₂O bei OD₂₆₀ gemessen (OD₂₆₀ ca. 0,7). Pro Slot wurde diejenige Menge aufgetragen, die einer OD₂₆₀ von etwa 7,0 entsprach, also etwa 10 µl.

Nach gründlichem Vermischen mit Auftragsmix (98% Formamid, 10 mM EDTA, 0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylencyanol) wurden die Proben für 2 min im Wasserbad aufgekocht und anschließend auf Eis abgekühlt.

Nach 30 minütigem Vorlauf des Gels bei einem Spannungsgradienten von 15 Volt/cm (1x TBE als Laufpuffer) und gründlichem Spülen der Auftragstaschen wurde das Gel beladen und ebenfalls bei 23 Volt/cm gefahren bis das Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreicht hatte (Laufzeit 14 h).

Zur Isolierung der Oligonukleotide aus obigem Gel wurde die obere Glasplatte abgenommen und durch eine Haushaltsfolie ersetzt, auf welche eine Kieselgel-Dünnschichtchromatographieplatte gelegt wurde, die mit einem bei 254 nm absorbierenden Fluoreszenzfarbstoff beschichtet ist (Merck, Kieselgel 60, F 254). Auf diese wurde sodann zur Stabilisierung eine weitere Glasplatte gelegt. Nach Wenden des Gels samt Fluoreszenz- und Glasplatte wurde das Gel von oben mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt, wobei die Oligonukleotide durch ihre Fluoreszenzauslöschung als dunkle Banden gut erkennbar waren. Die oberste und zugleich stärkste Bande, die dem gewünschten Oligonukleotid entspricht, wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in eine an der Spitze abgeschmolzene und mit silanisierter Glaswolle gestopfte 1 ml Plastikspitze überführt. Nach mechanischer Zerkleinerung der Gelstückchen wurden 800 µl H₂O zugegeben, die Spitze gut mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (Maxam und Gilbert, 1980). Dann wurde die abgeschnittene Pipettenspitze in ein Eppendorfgefäß gestellt und zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge, 2 min), wobei sich das Eluat, welches das Oligonukleotid enthält, im Eppendorfgefäß sammelt, die Gelteilchen aber durch die Glaswatte zurückgehalten werden. Auf erneutes kurzzeitiges Eluieren mit 500 µl H₂O und Zentrifugation folgte DNA-Fällung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2, 1/10 Volumen 0,1 M MgCl₂ und 2,5 Volumina absolutem Ethanol bei -80 °C über Nacht. Das Präzipitat wurde bei 20000 rpm für 60 min zentrifugiert (Sorvall Rotor SS34, 4 °C), in 100 µl 0,3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 und 10 mM MgCl₂ aufgenommen.

3.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

-Mit DEAE-Membran

Die Isolierung von DNA-Fragmenten bis zu einer Größe von etwa 1 kb erfolgte nach einer von Winberg und Hammerskjöld (1980) beschriebenen Methode. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem Agarosegel wurde unter langwelligem UV-Auflicht vor das zu isolierende Fragment mit einem Skalpell ein Schnitt in der Größe der Fragmentbande gesetzt, und eine ebenso große, vorbehandelte DEAE-Cellulose-Membran (Schleicher und Schuell, NA-45) eingesetzt, an welcher bei Fortsetzung der Gelelektrophorese die DNA gebunden wurde. Unter langwelligem UV-Auflicht war die DNA als rot fluoreszierende Bande auf der Membran sichtbar. Nach Abschneiden der nicht fluoreszierenden Bereiche der Membran wurde mit bidest. H₂O kurz gewaschen, um anhaftende Agarosepartikel zu entfernen. Danach wurde die Membran in ein Eppendorfgefäß überführt und mit NET-Hochsalzpuffer überschichtet. 1-2 stündige Inkubation bei 68 °C führte zur Eluation der gebundenen DNA. Nach Abpipettieren des Eluats wurde nochmals in obigem Puffer (ca. 100 µl) eluiert und aus den vereinigten Eluaten durch mehrmalige Extraktion mit H₂O-gesättigtem n-Butanol das Ethidiumbromid entfernt. Nach Fällung der DNA mit 2,5 Volumina absolutem Ethanol und Zentrifugation bei 15000 rpm für 20 min (Sigma Tischzentrifuge, -20 °C) wurde die DNA aus 0,3 M Natriumacetat-Lösung erneut präzipitiert und anschließend in einem geeigneten Volumen TE aufgenommen.

-Aus niedrig schmelzender Agarose

Die Fragmentisolierung aus niedrig schmelzender Agarose (Sigma Typ VII, A-4018; für kleine Fragmente: Nu Sieve Agarose) fand vor allem bei der Isolierung geringer DNA-Mengen Verwendung. Als vorteilhaft erwies sich das Verfahren auch bei der Isolierung von Fragmenten, die aufgrund ähnlicher Größe im Agarosegel nur wenig voneinander getrennt waren.

Nach erfolgter Elektrophorese wurde die entsprechende Bande unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten, in einem Eppendorfgefäß mit doppeltem Volumen TE-Puffer bei 65 °C 10 min geschmolzen und anschließend mit einem gleichen Volumen Phenol vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Phasen durch Zentrifugation (Eppendorfszentrifuge, 5 min) getrennt. Die obere, wäßrige Phase wurde abgenommen,

zunächst mit Phenol/Chloroform (1:1) und anschließend mit CIA extrahiert. Die so erhaltene DNA wurde wie üblich gefällt und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

-Durch Elektroelution

Diese Methode liefert bei der Isolierung größerer DNA-Mengen, vor allem bei der Isolierung von Fragmenten mit höherem Molekulargewicht (>2 kb) die besten Ausbeuten und die reinste DNA.

Nach Auftrennung der DNA durch Gelelektrophorese wurde unter langwelligem UV-Licht vor dem zu isolierenden DNA-Fragment ein ca. 4 mm breiter Bereich in der Länge der Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und eine Dialysemembran derartig eingelegt, daß der entstandene Ausschnitt nach unten und in Laufrichtung wieder abgedichtet war. Wurde nun die so entstandene, vor dem zu isolierenden Fragment gelegene Kammer etwa zur Hälfte mit autoklaviertem 1/2x Laufpuffer gefüllt und der Puffer in der Elektrophoresekammer soweit abgesenkt, daß das Gel gerade noch eintauchte, konnte die Elektrophorese fortgesetzt werden. Nach einigen Minuten wurde unter langwelligem UV-Licht das in die Kammer gewanderte und an der Dialysemembran aufgehaltene, rötlich fluoreszierende DNA-Fragment nach Umpolen (ca. 10 sec) direkt aus der Kammer abpipettiert.

Durch mehrmalige Extraktion mit n-Butanol wurde sowohl Ethidiumbromid entfernt, als auch - falls nötig - das Volumen verringert. Wie üblich folgten DNA-Fällung und Aufnahme in TE-Puffer.

3.2.7 Konzentrierung von DNA und RNA und Inaktivierung kontaminierender Proteine

Proteine und Enzyme, die bei enzymatischen Modifikationen an DNA und RNA eingesetzt worden waren oder isolierte DNA und RNA kontaminierten (vor allem DNasen und RNasen), wurden durch Phenolisierung inaktiviert. Hierzu wurde mit TE (20/5, pH 8,0) gesättigtes Phenol im gleichen Volumenverhältnis mit der DNA oder RNA gründlich vermischt und für 5 min zur Phasentrennung zentrifugiert. Nach Abnahme der oberen, wäßrigen Phase wurde diese mit Phenol/Chloroform (1:1) und anschließend mit CIA erneut extrahiert.

Konzentrierung von DNA und RNA erfolgte entweder durch Ethanolfällung oder durch mehrmalige Extraktion mit n-Butanol, wobei zur Phasentrennung zentrifugiert wurde. Die DNA oder RNA wurde hierzu mit 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 bis 2,5 Volumina an absolutem Ethanol versetzt und mindestens 20 min bei -80 °C inkubiert. Sollten extrem geringe DNA-Mengen gefällt werden (im ng-Bereich), wurden - sofern keine enzymatischen Reaktionen folgten - etwa 1-2 µg Hefe t-RNA als "carrier" zugesetzt. Zur Entfernung von Salzen wurde die abzentrifugierte DNA oder RNA mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, im "speed vac" getrocknet und in TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4° C (Gradientengereinigte Plasmid-DNA; Chromosomale DNA) oder bei -20 °C (Schnellaufschluß-DNA). RNA wurde stets in 70% Ethanol bei -20 °C aufbewahrt.

3.3 Analyse von DNA und RNA

3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Horizontale Agarosegele der Dicke 4-12 mm fanden zur Identifizierung von DNA und DNA-Restriktionsfragmenten Verwendung. Je nach Größe der zu untersuchenden DNA wurden Agarosekonzentrationen von 0,4 - 2,0% gewählt. Nach Einwiegen der entsprechenden Menge an Agarose in 1x Laufpuffer wurde im Mikrowellenherd kurz aufgeköcht und nach Abkühlen auf 60 °C mit Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml in H₂O) bis zu einer Endkonzentration von ca. 0,5 µg/ml versetzt. Übliche Elektrophoresebedingungen waren 20-50 Volt bei einem Stromfluß von 15-30 mA. Enthielten die Gele selbst kein Ethidiumbromid, erfolgte die Anfärbung nach beendeter Elektrophorese in einer Ethidiumbromid-Lösung der Konzentration 10 µg/ml. DNA-Banden wurden durch Bestrahlen mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (Chroma-41 UV-Lampe) sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera mit Orangefilter auf Polaroid-Film (Typ 107) fotografiert.

Zur Auftrennung sehr kleiner DNA-Fragmente (30 bp bis einige hundert bp) wurden 4% Nu-Sieve Agarosegele verwendet. Die Trennleistung solcher Gele erreicht nahezu diejenige von Polyacrylamidgelen.

3.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von kleinen Fragmenten wurden neben Nu Sieve Gelen auch herkömmliche 6-8% Polyacrylamid-Gele verwendet, wobei 1x TBE als Laufpuffer diente. Spezielle Polyacrylamid-Gele sind unter 3.2.5 (Reinigung von Oligonukleotiden), unter 3.7.3 (Sequenzgele) und unter 3.8.2 (Laemmli-Gele) beschrieben.

3.3.3 Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Zur Elektrophorese von RNA eignen sich sowohl Formaldehyd-Gele als auch Glyoxal-Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8-1,2%. Bei Verwendung eines Glyoxalgels, welches im Gegensatz zu Formaldehydgelen nicht denaturierend ist, wurde die RNA durch vorherige Behandlung mit Glyoxal denaturiert. Durch Umpumpen des Elektrophoresepuffers wurde das durch die Elektrophorese entstehende pH-Gefälle ausgeglichen.

-Formaldehyd-Gele

Zur Herstellung von Formaldehydgelen wurde eine entsprechende Menge Agarose in H₂O eingewogen und durch Aufkochen im Microwellenherd gelöst. Nach Abkühlen auf 60 °C wurde 1/10 des Endvolumens an 10x Gelpuffer (100 mM MOPS, pH 7,0; 50 mM EDTA, pH 8,0) und so viel 37% Formaldehydlösung zugefügt, daß sich eine 2,2 M Endkonzentration ergab (Lehrach et al., 1977; Goldberg 1980). Das flüssige Gel reizt stark die Schleimhäute und muß daher unter dem Abzug gegossen werden. Die in H₂O gelösten oder lyophilisierten RNA-Proben wurden in 20 µl "heating-buffer" (1x Gellaufpuffer; 50% Formamid; 2,2 M Formaldehyd) gelöst und 25 min bei 60 °C im Wasserbad erhitzt. Nach Mischen mit Auftragspuffer (50% Glycerin; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,4% Bromphenolblau) wurden die Proben auf ein Horizontalgel aufgetragen und bei 80 Volt unter Umpumpen des Laufpuffers elektrophoretisch aufgetrennt.

-Glyoxalgele

Bei Verwendung von Glyoxalgelen wurden die DNA-Proben durch 60 minütiges Erhitzen bei 50 °C in folgendem Mix denaturiert:

(McMaster und Carmichael, 1977):

6M Glyoxal	2,7 µl
DMSO	8,0 µl
0,1 M NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0)	1.6 µl
RNA (bis zu 20 µg)	3,7 µl

Die entsprechende Menge Agarose wurde durch Erhitzen in 10 mM NaH₂PO₄ -Puffer (pH 7,0) gelöst, welcher auch als Gellaufpuffer diente. Die Elektrophorese fand wiederum bei 80 Volt und unter ständigem Umpumpen des Puffers statt.

Sollten RNA-Gele angefärbt werden, so geschah dies erst nach beendeter Elektrophorese. Die Gele wurden hierzu entweder in Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) oder in Acridinorange-Lösung (30 mg/ml) für etwa 15 min geschwenkt und anschließend in H₂O gespült.

3.3.4 TCA-Fällung von DNA oder RNA und Szintillationszählung

Um die Höhe des radioaktiven Einbaus an ³²P-dNTP's in DNA oder RNA zu messen, wurde ein Aliquot der markierten Probe mit einem 10-20 fachen Volumen an eiskalter 5% TCA (Trichloressigsäure) versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und der Niederschlag auf GF/C-Filtern gesammelt. Nach Spülen mit 5% TCA wurde mit eiskaltem 96% Ethanol durchgesaugt (Wasserstrahlpumpe). Die Filter wurden getrocknet, mit 5 ml Quickzint versetzt und 1 min lang im Szintillationszähler gemessen.

3.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wurde photometrisch bei UV-Licht der Wellenlänge 260 bzw. 280 nm (Beckman Photometer DU 50) bestimmt. Hierbei wurde die Formel:

$20 \text{ OD}_{260/280} = 1 \text{ mg/ml DNA oder RNA zu Grunde gelegt.}$

Bei der Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden muß die unterschiedliche Adsorption der verschiedenen Nukleotide durch Einführung von Koeffizienten berücksichtigt werden. Die Extinktionskoeffizienten für 260 nm und 1 µmol/ml lauten:

$$\begin{aligned} dT &= 8,8 \\ dG &= 11,8 \\ dA &= 15,0 \\ dC &= 7,4 \end{aligned}$$

Für das Oligonukleotid OTM 5 (31mer) mit der Zusammensetzung T₁₀G₆A₄C₁₁ ergibt sich beispielsweise die Adsorption für 1µmol/ml
 $OD_{260} = 10 \times 8,8 + 6 \times 11,8 + 4 \times 15,0 + 11 \times 7,4 = 300,2;$

3.3.6 Kartierung des 5'-Endes von mRNA

Zur Bestimmung des Transkriptionsstarts einer bestimmten mRNA wurden zwei Verfahren angewandt.

-S1-Kartierung

Das DNA-Fragment, welches die hypothetische Startstelle für die Transkription enthält, wurde, wie unter 3.5.4 beschrieben, mit γ -³²P-dATP am 5'-Ende markiert. Drei Aliquots von je 100 µg der entsprechenden RNA wurden aus 70% Ethanol gefällt, in 50 µl H₂O (mit Diethylpyrocarbonat behandelt) aufgenommen, erneut gefällt und gewaschen und in 30 µl S1-Hybridisierungs-Puffer (40 mM Pipes, pH 6,8; 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 70% Formamid) aufgenommen. Nach Zugabe von je 100 ng (2 µl) obigen Fragmentes und Denaturierung bei 80 °C für 15 min wurden die Aliquots ohne Abkühlung direkt in Wasserbäder mit 58 °C, 62 °C und 66 °C überführt und bei diesen Temperaturen 3 h hybridisiert. Danach erfolgte Zugabe von je 300 µl S1-Reaktions-Puffer (30 mM Natriumacetat, pH 4,6; 1 mM ZnSO₄; 250 mM NaCl;) mit je 100 U S1-Nuklease (Boehringer) und sofortige Überführung der Aliquots in ein 37 °C Wasserbad. Die Reaktion wurde nach 30 minütiger Inkubation mit 50 µl Stoppuffer (4 M Ammoniumacetat; 0,1 M EDTA, pH 8,0) und Inkubation auf Eis beendet. Nach Phenolisierung mit Phenol/Chloroform (1:1) und Ethanol-fällung unter Verwendung von 2µg Hefe-tRNA als "carrier" wurde in 10 µl Formamid-Auftragspuffer aufgenommen. Die Auftrennung erfolgte auf einem Sequenzgel (8 M Harnstoff; 8% Polyacrylamid).

-Primer Extension

Die Methode wurde modifiziert nach Elion und Warner (1983) durchgeführt.

20 µg der entsprechenden RNA (Gesamt-RNA aus Bakterien bzw. Hefe-tRNA als Kontrolle) wurden aus 70% Ethanol zentrifugiert, in 50 µl H₂O (mit Diethylpyrocarbonat behandelt) aufgenommen, erneut gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 61 µl H₂O gelöst und mit 10 µl 10x AMV-Reverse-Transkriptase-Puffer (500 mM Tris/Cl, pH 8,3; 1,5 M KCl; 70 mM MgCl₂; 5 mM EDTA) und mit 20 µl einer dNTP-Lösung (je 2,5 mM an dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sowie mit 1 µl 100 mM DTT-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 1,5 pmol (3 µl) des entsprechenden Oligonukleotids (OTM 5), welches zuvor mit γ -³²P-dATP am 5'-Ende markiert worden war, wurde der Ansatz bei 70 °C für 2 min erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Dann wurden 40 U (1 µl) RNasin zugesetzt, bei 48 °C für 5 min inkubiert (Primer annealing) und nach Abkühlen auf 37 °C erneut 80 U (2 µl) RNasin zugesetzt. Nach Zugabe von 15 U (1 µl) AMV-Reverse-Transkriptase (Boehringer) und 20 U (2 µl) AMV-Reverse-Transkriptase (Life Science) folgten weitere 30 min Inkubation bei 37 °C und anschließend 45 minütige Inkubation bei 42 °C. Daraufhin wurde die RNA durch Zusatz von 25 µl 1N NaOH und 3 minütiges Erhitzen auf 100 °C zerstört. Nach Abkühlen auf Eis und Neutralisierung mit 25 µl 1N HCl wurden 3 µg Hefe-tRNA als "carrier" zugesetzt. Mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2, 1/100 Volumen 1 M MgCl₂ und 2,5 Volumina absolutem Ethanol wurde das Gemisch bei -80 °C über Nacht präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 15000 rpm für 60 min (Sigma Tischzentrifuge, -20 °C) wurde mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und das Pellet nach Trocknen in 8 µl Formamid-Auftragspuffer aufgenommen. Die Auftrennung erfolgte auf einem Sequenzgel (8M Harnstoff; 8% Polyacrylamid).

3.4 Verfahren zur Auffindung spezifischer RNA und DNA

3.4.1 Southern-Transfer

Die Übertragung von DNA aus Agarose-Gelen wurde nach Southern (1975) durchgeführt.

Das Agarosegel wurde zunächst für 2x 20 min im Denaturierungspuffer, dann für 2x 20 min im Neutralisierungspuffer geschwenkt. Der pH-Wert der Neutralisierungs-Lösung bzw. des Gels darf danach nicht über 7,5 liegen.

Mehrere Whatman 3MM Papierstreifen wurden so über einen Plastikrost gezogen, daß sie durch Eintauchen in ein Vorratsgefäß mit 20x SSC die Flüssigkeit hochsaugen. Auf diesem Rost wurde ein mit 2x SSC angefeuchtetes Whatman 3MM Papier gelegt und darauf das Gel selbst, jedoch in umgekehrter Position, so daß die ursprüngliche Unterseite nach oben zu liegen kommt. Auf das Gel wurden nun ein gleich großer in 6x SSC getauchter Nitrozellulosefilter und darüber zwei ebenfalls gleich große Whatman 3MM Papierbögen gelegt. Vorhandene Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten konnten durch vorsichtiges Andrücken entfernt werden. Obenauf wurde ein Stapel Papierhandtücher gelegt, um den 20x SSC-Puffer durch das Agarose-Gel nach oben zu saugen, wodurch der Transfer der DNA auf den Nitrozellulosefilter bewirkt wird. Um einen Kurzschluß zwischen dem SSC-Reservoir und den Papierhandtüchern zu vermeiden, wurden die Ränder des Filters mit ca. 3 cm breiten Plastikstreifen abgedeckt. Bis ein großer Teil der Feuchtigkeit aus dem Gel nach oben diffundiert ist, wurde der Aufbau nur mit einer Glasplatte beschwert. Nach ca. 1 h konnte dann ein Gewicht von etwa 1 kg aufgelegt werden.

Je nach Größe der zu blottenden DNA wurde der Transfer nach 15 - 20 h beendet. Das nun stark geschrumpfte Gel wurde samt Filter umgedreht, so daß mit einem weichen Filzstift die Slots auf dem Filter markiert werden konnten. Anschließend wurde der Filter 5 min in 6x SSC geschwenkt, auf einem Whatman 3MM Papier getrocknet und zur Fixierung der DNA 2-4 h bei 80 °C gebacken.

3.4.2 Northern Transfer

Die Übertragung von RNA auf Nitrozellulosefilter erfolgte im wesentlichen wie unter 3.4.1 für DNA beschrieben. Formaldehyd wie auch Glyoxalgele wurden ohne weitere Vorbehandlung mit 20x SSC geblottet. Die Dauer des Transfers betrug 36-48 h. Da die Effizienz der Übertragung aus Gelen, die oder Acridinorange enthielten, wesentlich geringer ist, wurden zum Northern-Blot nur ungefärbte Gele verwendet. Sollten DNA-Marker mithybridisiert werden, wurden nach Elektrophorese die entsprechenden Spuren, die die Marker enthielten, ausgeschnitten, denaturiert, neutralisiert und anschließend wieder ins Gel eingefügt und mitgeblottet.

3.4.3 Hybridisierung von DNA und RNA

Nukleinsäuren, die zu einer ^{32}P -markierten DNA-oder RNA-Probe komplementär oder stark sequenzhomolog sind, lassen sich durch Hybridisierung und anschließende Autoradiographie nachweisen.

Das im folgenden beschriebene Verfahren gilt sowohl für geblottete DNA als auch für RNA. Bei der radioaktiven Probe kann es sich ebenfalls sowohl um DNA als auch um RNA handeln.

Kurz vor Gebrauch wurden der Hybridisierungslösung bis zu einer Endkonzentration von 400 $\mu\text{g/ml}$ Hefe-tRNA zugesetzt, welche durch 5 minütiges Erhitzen im siedenden Wasserbad und Abkühlen in Eiswasser denaturiert wurde. Maximal fünf der bei 80 °C gebackenen und mit 6x SSC befeuchteten Nitrozellulosefilter wurden in eine Polyethylen-Klarsichtfolie mit Hybridisierungslösung (ca. 0,1-0,2 ml/cm^2 Filterfläche) unter Vermeidung von Luftblasen eingeschweißt. Um alle unspezifischen, d.h. nicht von DNA-Proben bedeckten Bindungsstellen des Filters abzusättigen, wurde für mindestens 12 h im Schüttelwasserbad bei 42 °C inkubiert (Prähybridisierung). Danach wurde die gesamte Flüssigkeit vollständig entfernt und die Hybridisierungslösung (ca. 30-50 $\mu\text{l/cm}^2$ Filterfläche) mit der radioaktiven Probe eingefüllt. Diese wurde zuvor durch Aufkochen im siedenden Wasserbad und Abkühlen in Eiswasser denaturiert. Die erneut luftblasenfrei verschweißten Filter wurden für mindestens 12 h, jedoch nicht länger als 24 h, wie oben beschrieben, bei 42 °C inkubiert.

Anschließend wurden die Filter mit je 2x SSC/0,1% SDS-Lösung für jeweils zweimal 10 min bei Raumtemperatur und mit je 0,1x SSC/0,1% SDS-Lösung für jeweils zweimal 15 min bei 52-56 °C gewaschen (Standardbedingungen).

Der die radioaktive Lösung enthaltende Hybridisierungsmix kann bei 4 °C aufbewahrt und mehrmals verwendet werden.

Nach Trocknen bei Raumtemperatur auf Whatman 3 MM wurde mit den Filtern Autoradiographie durchgeführt.

3.4.4 Koloniehybridisierung

Um bestimmte Klone aus einer Cosmidgenbank oder nach Klonierungsexperimenten aufzufinden, wurde das Koloniehybridisierungsverfahren nach Hanahan und Meselson (1980) angewandt.

Auf die bis zu einer Größe von 1 mm Durchmesser gewachsenen Bakterienkolonien wurde ein trockener Nitrozellulosefilter gelegt und nach Benetzung auf frische Antibiotikum-Agarplatten überführt (Kolonien nach oben). Falls die Kolonien nicht schon zuvor im Raster auf zwei identische Agarplatten gepickt worden waren, wurde nach Anwachsen der Kolonien bei 37 °C durch kurzes Andrücken eines zweiten Filters ein sog. "Replika"-Filter erzeugt.

Um später einen bestimmten hybridisierenden Klon wiederzufinden, wurde die Lage des Filters auf der Agarplatte, bzw. die Orientierung von Replika-Filter bezüglich des ersten Filters asymmetrisch mit einem Filzstift markiert. Zusätzlich wurden mit einer sterilen Injektionsnadel drei Löcher in ebenfalls asymmetrischer Weise durch Filter und Agarplatte bzw. "Replika"-Filter gestochen. Falls es sich um ein amplifizierbares Plasmid handelte, wurden die Filter zur späteren Signalverstärkung auf Chloramphenicol-Platten übertragen (150 µg/ml) und 18 h bei 37 °C bebrütet. Die Filterabzüge wurden 5 min auf Whatman 3MM Papier inkubiert, welches mit 10% SDS durchtränkt war. Dann erfolgte Transfer auf 3MM Papier mit Denaturierungspuffer. Nach 10 - 20 min wurde auf 3MM Papier, das mit Neutralisierungspuffer getränkt war, für 5 min inkubiert. Nach weiterer 5-10 minütiger Inkubation auf 3MM Papier mit 2x SSC wurden die Filter bei 37 °C in ca. 50 ml Proteinase K-Puffer (10 mM Tris/Cl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,5% SDS; 20 µg/ml Proteinase K) geschwenkt. Nach Trocknen bei Raumtemperatur und Backen bei 80 °C konnte die Hybridisierung durchgeführt werden.

3.4.5 Autoradiographie

Hybridisierte Filter wurden auf Whatman 3MM Papier mit kleinen Klebestreifen fixiert und mit Küchenfolie abgedeckt. Unter Verwendung geeigneter Röntgenfilme (Kodak X-Omat AR; Fuji RX) wurde in einer Kassette mit Verstärkerfolie bei -80 °C exponiert. Um schärfere Banden zu erzielen, wurde bei genügend radioaktiv markierten und stark hybridisierenden Proben auch bei Raumtemperatur exponiert.

3.5 Enzymatische Modifikationen an DNA und RNA

3.5.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Üblicherweise wurde die DNA zur Spaltung in einer Konzentration von 20-300 µg/ml in einem Volumen von 20-200 µl eingesetzt. Sofern nicht die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet wurden, fanden die bei Maniatis et al. (1982) beschriebenen 10x Standard-Puffer (Niedrig-, Mittel- und Hochsalzpuffer) Anwendung, welche für den Großteil der Restriktionsendonukleasen geeignete Salzbedingungen enthalten.

10x Puffer	NaCl	Tris/Cl, pH 8,0	MgCl ₂	DTT
niedrig		100 mM	100 mM	10 mM
mittel	500 mM	100 mM	100 mM	10 mM
hoch	1 M	500 mM	100 mM	10 mM

10x Restriktionspuffer gemäß Maniatis et al., 1982;

Die Spaltungen wurden normalerweise bei 37 °C, im Falle von *TaqI* bei 55 °C, und einer Enzymkonzentration von 1-10 U/µg DNA durchgeführt. Benötigten Enzyme bei Mehrfachspaltungen verschiedene Pufferbedingungen, so wurde nacheinander gespalten, wobei die Pufferbedingungen für Enzyme mit höherem Salzgehalt durch "Aufsalzen" eingestellt wurden. Nach einer Inkubationsdauer von 2-4 h, für genomische DNA von 15 h, wurde die Reaktion mit 1/10 Volumen an 10x Stopppuffer (0,25% Xylencyanol; 0,25% Bromphenolblau; 100 mM EDTA, pH 8,0; 50% Glycerin) beendet.

3.5.2 Abspaltung von 5'-Phosphaten durch alkalische Phosphatase

Um die bei Spaltung mit Restriktionsendonukleasen entstehenden 5'-Phosphorsäuremonoester (5'-Phosphate) zu entfernen, wurde alkalische Phosphatase verwendet. Diese 5'-Phosphatspaltung ist einerseits notwendig, um effizient eine radioaktive 5'-Endmarkierung durchführen zu können, und andererseits, um bei Ligasereaktionen eine Rezirkularisierung des Vektors zu verhindern.

Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden hierzu mit 20x RAP-Puffer (800 mM Tris/Cl, pH 8,0; 100 mM MgCl₂; 2 mM ZnCl₂), bei alkalischer Phosphatase von Boehringer in neuerer Zeit nur noch mit TE-Puffer (pH 8,0) versetzt und 45 min bei 37 °C mit alkalischer Phosphatase einer Konzentration von 1 U/μg DNA inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte durch 15 minütiges Erhitzen bei 68 °C und Extraktion mit Phenol und CIA.

3.5.3 Auffüllen von überhängenden 5'-Enden mit Klenow-Polymerase

Für "blunt end"-Ligierungen und Linker-Additionen können 5' überhängende Enden, die bei Spaltung mit vielen Restriktionsendonukleasen entstehen, in glatte Enden überführt werden.

Die aufzufüllenden DNA-Fragmente wurden mit 1/10 Volumen 10x "Blunt-end-Mix" (500 mM Tris/Cl, pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 100 mM DTT; je 2,5 mM an dNTP's) und 2 U Klenow-Polymerase versetzt. Zunächst erfolgte die Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur, dann für 30 min bei 37 °C. Durch 5 minütiges Erhitzen bei 65 °C und anschließende Phenol- und CIA-Extraktion wurde die Reaktion beendet.

3.5.4 ³²P-Markierung von 5'-Enden mit T4-Polynukleotid-Kinase

- 5'-Markierung von Oligonukleotiden

5'-Hydroxylgruppen von Oligonukleotiden wurden mit γ -³²P-dATP und T4-Polynukleotid-Kinase markiert. Die Oligonukleotid-Lösung wurde hierzu mit 1/10 Volumen an 10x T4-Kinasepuffer B (500 mM Tris/Cl, pH 9,5; 100 mM MgCl₂; 50 mM DTT), 50-80 μCi γ -³²P-dATP und 10 U T4-

Polynukleotid-Kinase. versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch 3 µl EDTA, pH 8,0 (200 mM) wurde nicht eingebautes γ -³²P-dATP über eine DE 52 (Whatman) Anionenaustauschersäule durch mehrmaliges Waschen mit 0,2 M NaCl in TE (pH 8,0) und Zentrifugation (Tischzentrifuge) abgetrennt. Durch Spülen mit 1-2 ml 0,5 M NaCl und erneute Zentrifugation wurde das Oligonukleotid eluiert.

-5'-Markierung von DNA-Fragmenten

Die Markierung der 5'-Hydroxylgruppen von DNA-Fragmenten erfolgte wie die von Oligonukleotiden, jedoch unter Verwendung des 10x Kinasepuffers A (700 mM Tris/Cl, pH 7,6; 100 mM MgCl₂; 50 mM DTT). Nicht eingebautes γ -³²P-dATP wurde über eine Sephadex G50-fine Säule abgetrennt.

3.5.5 In-vitro Markierung von DNA mit α -³²P-dCTP

Nick-Translation

In einem als "Nick-Translation" bezeichneten Verfahren kann ³²P-Markierung von doppelsträngiger DNA durch Zugabe von DNaseI, DNA-PolymeraseI und radioaktivem α -³²P-dCTP bei gleichzeitiger Anwesenheit der übrigen nicht radioaktiven Nukleotide erreicht werden (Rigby et al., 1977).

Zur Markierung wurden üblicherweise 30-80 µCi α -³²P-dCTP eingesetzt, zu welchem zusammen mit der zu markierenden DNA in einem Gesamtvolumen von 20-50 µl folgendes Gemisch auf Eis zupipettiert wurde:

5 µl 10x "Nick-Translation"-Mix
200 pg DNaseI in H₂O
10 U DNA-PolymeraseI aus *E. coli*

Nach Inkubation bei 16 °C für 60 min wurde die Reaktion auf Eis durch Zugabe von 15 µl 200 mM EDTA (pH 8,0) abgestoppt. Sogleich danach wurden auf einer Sephadex G50 fine Säule die nicht eingebauten Nukleotide von der Plasmid-DNA abgetrennt. Hierzu wurde die untere Öffnung einer sterilen Pasteurpipette locker mit autoklaviertem Haushaltstuch gestopft und die Pipette mit Sephadex G50 fine gefüllt, welches mit TE-Puffer äquilibriert war. Durch Elution mit TE-Puffer wurden Fraktionen zu je 120 µl gesammelt und mit Hilfe eines Handmonitors diejenigen Fraktionen ermittelt, welche die

markierte DNA enthielten. Bei gleichem Säulenvolumen und einem Vorlauf von 300 µl waren dies in reproduzierbarer Weise die Fraktionen 7 bis 9, aus welchen nach Vereinigung ein Aliquot entnommen und die Höhe des radioaktiven Einbaus im Szintillationszähler bestimmt wurde. Üblicherweise wurde eine Markierung von 5×10^7 - 1×10^8 cpm/µg DNA erreicht.

Random Oligonukleotid Priming

Die von Feinberg und Vogelstein (1983) entwickelte Methode beruht auf der Hybridisierung einer Mischung von Hexanukleotiden aller möglichen Basensequenzen an die zu markierende DNA. Der komplementäre Strang wird anschließend mit Klenow-Polymerase von den 3'-Enden der "random primer" synthetisiert.

25-100 ng der zu markierenden DNA wurden durch 5 minütiges Erhitzen im kochenden Wasserbad und anschließendes Abkühlen in Eiswasser denaturiert. Nach Zugabe der dNTP-Lösung (je 0,5 mM an dATP, dGTP und dTTP) wurden 2 µl "Reaktionsgemisch" (Hexanukleotidgemisch und 10x Klenow-Puffer; Boehringer) hinzugefügt und das Volumen mit H₂O auf 19 µl. Die Reaktion wurde mit 1 µl Klenow-Polymerase (2 U) gestartet und nach Inkubation bei 37 °C für 30 min durch Zugabe von 2 µl 200 mM EDTA (pH 8,0) abgestoppt. Die Abtrennung von nicht eingebauten Nukleotiden erfolgte wie oben beschrieben.

3.5.6 Kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

DNA-Fragmente wurden zur Klonierung kovalent mit geeigneten Vektoren durch T4-DNA-Ligase verknüpft. Üblicherweise wurden 25-100 ng Vektor-DNA in einem äquimolaren Verhältnis mit dem zu ligierenden DNA-Fragment eingesetzt. Zum Reaktionsansatz (20-40 µl) wurden 1/10 Volumen 10x Ligasepuffer A (500 mM Tris/Cl, pH 7,8; 100 mM MgCl₂; 200 mM DTT; 10 mM ATP) und 2-5 Einheiten T4-DNA-Ligase gegeben. Die Ligation wurde über Nacht bei 16 °C im Kaltraum durchgeführt.

Bei "blunt-end"-Ligierungen wurde statt obigem Ligasepuffer meist 5x Ligasepuffer B (250 mM Tris/Cl, pH 7,6; 50 mM MgCl₂; 25% PEG (8000); 5 mM ATP; 5 mM DTT) verwendet.

3.5.7 ³²P-Markierung von RNA

Gesamt-RNA aus Bakterien wurde mit γ -³²P-dATP und T4-Polynukleotid-Kinase am 5'-Ende radioaktiv markiert. Um für Hybridisierungszwecke eine ausreichend hohe Markierung zu erzielen, muß zuvor eine große Anzahl an 5'-Enden erzeugt werden. Dies wurde durch partielle alkalische Hydrolyse erreicht.

5 µg lyophilisierte RNA wurden in 10 µl Hydrolysepuffer aufgenommen (50 mM Tris/Cl, pH 9,5; 5 mM Glycin; 10 mM Spermidin; 10 mM EDTA) und 5-10 min bei 90° C erhitzt. Nach Abkühlen auf Eis wurden 2 µl 10x Kinasepuffer B (3.5.4), 120 µCi γ -³²P-dATP (12 µl), 4 µl H₂O und 2 µl (10U) T4-Polynukleotid-Kinase zugegeben. Nach Inkubation bei 37° C für 1 h wurde die Reaktion mit 5 µl 200 mM EDTA (pH 8,0) beendet und nicht eingebaute Nukleotide über eine Sephadex G50 fine Säule abgetrennt (3.5.5). Die Effizienz der Markierung wurde im Szintillationszähler bestimmt.

3.6 Klonierung von DNA-Fragmenten in *E. coli*

3.6.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Viele Bakterienstämme können nach Cohen (1974) durch Behandlung mit MgCl₂ und CaCl₂ kompetent gemacht werden.

Eine Übernachtskultur des entsprechenden Stammes wurde 1:100 mit frischem LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 gezüchtet. Nach Zentrifugation bei 4 °C für 10 min (Tischzentrifuge, 3000 rpm) wurde das Pellet im halben Ausgangsvolumen eiskalten Puffers (50 mM CaCl₂; 1 mM Tris/Cl, pH 8,0) resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und nach erneuter Zentrifugation in 1/10 Ausgangsvolumen des obigen Puffers resuspendiert. Die nun kompetenten Bakterien wurden mit 20% Glycerin eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.6.2 Transformation der Bakterien

Zur Transformation wurden 100 µl der nach diesem Verfahren behandelten Bakterien mit 20-200 ng der aufzunehmenden DNA vermischt und 60 min auf Eis inkubiert. Nach 2 minütigem Hitzeschock bei 42 °C wurde auf Eis abgekühlt und der Ansatz mit 800 µl LB-Medium versetzt. Zur Expression des entsprechenden Antibiotikums wurde für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 200-300 µl des Transformationsansatzes auf Agarplatten ausplattiert, welche ein geeignetes Antibiotikum enthielten, das die Selektion derjenigen Bakterien ermöglicht, die die DNA aufgenommen haben. Die Platten wurden bei 37 °C für 14-16 h bebrütet.

3.7 DNA-Sequenzierung an doppelsträngiger Plasmid-DNA nach dem Sanger-Verfahren

3.7.1 Sequenzierung mit Klenow-Polymerase

Die von Sanger et al., (1977) entwickelte Methode der DNA-Sequenzierung mit Dideoxynukleotiden (Kettenabbruchverfahren) konnte erstmals von Smith et al., (1979) und Wallace et al., (1981) auch mit doppelsträngiger Plasmid-DNA durchgeführt werden. Die Sequenzierung von Schnellaufschluß-DNA wurde nach diesem, von Chen und Seeburg (1985) verbesserten und von Heinrich (1986) modifizierten Verfahren unter Verwendung von Klenow-Polymerase durchgeführt. Zur Sequenzierung aus pUC-Vektoren wurden von Dr. Mertz synthetisierte Oligonukleotide als Primer verwendet:

Sequenz des Universal-Primers: 5'-TCCCAGTCACGACGT-3'

Sequenz des Reverse-Primers: 5'-AACAGCTATGACCATG-3'

Entscheidend für das Gelingen der Sequenzreaktion ist der Zustand der eingesetzten DNA, welche vorwiegend nach der Schnellaufschluß-Methode (3.2.2) unter Vermeidung mechanischer Beanspruchung präpariert wurde. In einzelnen Fällen wurde auch Plasmid-DNA verwendet, welche über CsCl-Gradienten gereinigt war.

2 µg lyophilisierte Plasmid-DNA wurden in 40 µl Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH; 0,2 mM EDTA) aufgenommen und nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 4 µl 2 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 4,5) neutralisiert. Mit 2 Volumina an absolutem Ethanol wurde die DNA bei -80 °C präzipitiert (10 min) und nach Zentrifugation (Sigma-Tischzentrifuge, 15000 rpm, 4 °C, 15 min) mit 70% Ethanol gewaschen. Zu der auf diese Weise denaturierten DNA wurde 1 µl (2-5 pmol) Oligonukleotid-Primer, 1,5 µl "Annealing"-Puffer, 2 µl α -³⁵S-dATP und 9,5 µl H₂O hinzugefügt. Nach Inkubation für 20 min bei 37 °C ("Primer-Annealing") wurde 1 µl (2U) Klenow-Polymerase zugegeben und mit der Pipettenspitze gut vermischt. 3 µl dieses Reaktionsgemisches wurden zu jeweils 2 µl A-, C-, G- und T-Mix pipettiert, erneut gut vermischt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Zu jedem Reaktionsansatz wurden danach 1,5 µl "Chase-Lösung".(je 125 µM an dNTP's) hinzupipettiert und die Inkubation für weitere 15 min fortgesetzt. Nach Lyophilisieren im "speed vac" wurden die Proben in 4 µl Formamid-Auftragsmix aufgenommen und entweder sofort für die Gelelektrophorese verwendet oder bei -80 °C aufbewahrt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben 2 min im siedenden Wasserbad aufgekocht und im Eiswasser abgekühlt. Ca. 0,5-1,5 µl wurden auf das Sequenzgel aufgetragen.

"Annealing-Puffer" (10x):	70 mM Tris/Cl, pH 8,0
	70 mM MgCl ₂
	300 mM NaCl
	100 mM DTT
	1 mM EDTA

Formamid-Farbstoff-Mix:	98% Formamid
	10 mM EDTA
	0,2% Bromphenolblau
	0,2% Xylencyanol

Sequenz-Mixe:

Nukleotide	A-Mix	C-Mix	G-Mix	T-Mix
	μM	μM	μM	μM
dTTP	100	100	100	5
dCTP	100	10	100	100
dGTP	100	100	5	100
ddGTP	—	—	120	—
ddCTP	—	100	—	—
ddATP	100	—	—	—
ddTTP	—	—	—	500

3.7.2 Sequenzierung mit "Sequenase™"

Neben dem oben beschriebenen Sequenzierungsverfahren wurde auch der von der Firma US Biochemical Corporation entwickelte Sequenase-Kit verwendet. Die als "Sequenase" bezeichnete T7-Polymerase zeichnet sich durch höhere Prozessivität und geringere 3', 5'-Exonuklease-Aktivität aus. Während bei obigem Verfahren mit Klenow-Polymerase dNTP's und ddNTP's gleichzeitig eingesetzt worden waren, wurde bei der Sequenzierung mit "Sequenase™" die Reaktion mit einer niedrigen Konzentration an dNTP's gestartet und danach mit ddNTP's versetzt.

Präparation der DNA, Denaturierung, Neutralisierung und Primer-Annealing wurden wie unter 3.7.1 durchgeführt. Alle weiteren Schritte wurden exakt nach der Vorschrift des Amersham-Kits durchgeführt.

3.7.3 Sequenzgele

Die sequenzierten Proben wurden auf 5% igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen aufgetrennt. Um die starke Auftrennung der Banden im unteren Teil des Gels zu komprimieren und im oberen Teil eine möglichst hohe Auflösung zu erreichen, wurden die Gele keilförmig von 0,1 mm bis 0,4 mm Dicke gegossen. Die zum Gießen der Gele verwendete Macrophor-Apparatur, Spannungsgerät und Elektrophoresekammer waren von der Firma LKB. Vor

dem Gießen wurden die Platten mit 5% SDS-Lösung und 0,5 M NaOH-Lösung gereinigt und folgendermaßen vorbehandelt:

Haftplatte:

18,7 µl γ -Methacryloxypropyl-trimethoxysilan und 187 µl 10% Essigsäure wurden mit 5 ml absolutem Ethanol vermischt und mit einem Haushaltstuch auf der Platte verteilt. Nach Trocknen (ca. 5 min) wurde poliert, erneut mit 5 ml Ethanol behandelt und nach weiteren 5 min nochmals poliert.

Thermostatisierplatte (Firma LKB):

5 ml Dichlordimethylsilan-Lösung (5% in Chloroform) wurden auf der Platte verteilt und nach fünfminütigem Trocknen poliert. Nach Wiederholung dieses Vorgangs war die Platte stark hydrophob und gewährleistete, daß das Gel nach der Elektrophorese beim Trennen der Platten auf der Haftplatte verblieb.

Auf die so behandelte Thermostatisierplatte wurden 0,1 mm dicke Spacer von 60, 35, 20 und 10 cm Länge in der Weise angelegt, daß ein von oben nach unten weisender Keil entstand (Gellänge 60 cm).

Die Elektrophorese wurde bei einer Temperatur von 68 °C und einer Stromstärke von 28 mA (Spannung 2800 V) durchgeführt. Nach beendeter Elektrophorese wurde der Harnstoff 20 min mit 10% Essigsäure aus dem auf der Haftplatte befindlichen Gel herausgewaschen. Vor der Autoradiographie wurde das Gel bei 80 °C getrocknet (ca. 2 h).

Laufpuffer (10x TBE):

1 M Tris
830 mM Borsäure
10 mM EDTA

Acrylamid-Lösung(5%):

42 g Harnstoff
4,75 g Acrylamid
250 mg Bisacrylamid
10 ml 10x TBE ad 100 ml H₂O

Vor dem Gießen des Gels wurde die Lösung steril filtriert (Millipore-Filter) und mit 800 µl Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (10%) und 40 µl TEMED versetzt und gut vermischt.

3.8 Nachweis von IL-2 durch Western Blot Analyse

3.8.1 Lysis der Bakterien und SDS-Gelelektrophorese

Lysis der Bakterien

Die Induktion des *E. coli* Stammes, welcher IL-2 unter Kontrolle des tac-Promotors exprimiert, erfolgte nach Abzentrifugieren einer Übernachtskultur. Die Bakterien wurden hierzu in 100 ml LB-Medium resuspendiert, nach einstündiger Vorinkubation mit IPTG (Endkonzentration 5 mM) versetzt und 3 h weitergeschüttelt.

Sowohl der induzierte *E. coli* Stamm als auch die entsprechenden *M. clara* Stämme wurden nach Zentrifugation in 1/40 Volumen Puffer A (50 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10% Glycerin) resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 5 mg/ml) wurde für 15 min auf Eis inkubiert und 3x 20 sec ultrabeschallt. Zur Elektrophorese wurden 5-20 µl dieses Extrakts verwendet.

Laemmli-SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch 11%ige SDS-Acrylamid-Gele:

11 ml Lösung A (30% Acrylamid, 0,8% N,N'-bis-methyl-acrylamid)

6 ml Lösung B (1,5 M Tris pH 8,8, 0,4% SDS)

13,5 ml H₂O

480 µl Ammoniumperoxodisulfat

24 µl TEMED

Der verwendete Gellaufpuffer hatte folgende Zusammensetzung:

9,1 g Tris

43,2 g Glycin

3 g SDS H₂O ad 3 l

Um eine vollständige Denaturierung zu erzielen, wurden die Proben vor der Gelelektrophorese 5 min im Auftragspuffer bei 95 °C erhitzt.

3.8.2 Western Blot und Antikörper-Reaktion

Nach Elektrophorese bei 60 mA für etwa 2,5 h wurden die Proteine elektrophoretisch auf einen Nitrozellulosefilter übertragen. Hierzu wurde die Blot-Apparatur der Firma Bio-Rad verwendet (18 h bei 33V; Puffer: 50 mM Tris pH 8,3; 192 mM Glycin, 20% Methanol).

Nach beendetem Blotten wurde der Nitrozellulosefilter in TBST (10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) gewässert und bei 37 °C für 1 h mit 3% Milchpulver prähybridisiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde der IL-2 Antikörper (80 µg/30 ml) zugegeben und weitere 2 h inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST wurde mit dem zweiten Antikörper (alkalische Phosphatase gekoppelter Anti-Maus Antikörper, 4 µg/30 ml) für etwa 5 h inkubiert. Danach wurde wiederum mehrmals mit TBST gewaschen und anschließend mit folgender Färbelösung im Dunkeln inkubiert:

10 ml AP-Puffer (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂)

66 µl NBT-Lösung (50 mg/ml NBT in H₂O/DMF 1:1)

33 µl BCIP-Lösung (50 mg/ml in AP-Puffer)

Das Abstoppen der Färbereaktion erfolgte in bidest. Wasser.

4. ERGEBNISSE

4.1 Identifizierung transkriptionsaktiver Bereiche der Plasmide pBE-3 und pBE-2

Durch Northern Blot Analyse war gezeigt worden, daß die Plasmide pBE-2 (46 kb) und pBE-3 (16 kb) in hohem Maße transkriptionsaktiv sind (Metzler, 1984). Da zu Beginn dieser Arbeit bezüglich biologischer Funktion und Transkription der Plasmide nichts Näheres bekannt war, wurde versucht, eine Transkriptionskarte zu erstellen.

4.1.1 Kartierung der Transkriptionsaktivität von pBE-3 und pBE-2 in *M. clara*

Zunächst wurde untersucht, ob auf den Plasmiden pBE-2 und pBE-3 Bereiche unterschiedlicher Transkriptionsaktivität existieren. Da von beiden Plasmiden Restriktionskarten erstellt sind (Marquardt et al., 1984), bot sich die Möglichkeit, auf Nitrocellulose-Filter fixierte Restriktionsfragmente der Plasmide mit radioaktiv markierter Gesamt-RNA aus dem jeweiligen Bakterienstamm zu hybridisieren und positiv reagierende Fragmente mittels der Restriktionskarte auf dem Plasmid zuzuordnen und somit transkriptionsaktive Bereiche einzugrenzen.

Transkription des Plasmids pBE-3

Nach Auftrennung der Restriktionsfragmente von pBE-3 auf einem 0,8% Agarosegel und Transfer auf NC-Filter wurde mit 5-10 µg partiell hydrolysiertes, 5'-³²P-markiertes Gesamt-RNA aus *M. clara* BE-3 hybridisiert (Abb.4.1.-1A). Der Filter wurde nach Autoradiographie mit ³²P-markiertem pBE-3 erneut hybridisiert, um eine eindeutige Zuordnung der gegen die RNA hybridisierenden Fragmente treffen zu können (Abb.4.1.-1B). Bei Spaltung von 1,5 µg pBE-3 DNA mit *Ava*I hybridisierte nur das Fragment 2, bei Spaltung mit *Pvu* II/*Hinc*II nur das Fragment 1.

Um schwächer transkribierte Bereiche nachweisen zu können, wurden jeweils 4 µg pBE-3 DNA in Form des pBR322/pBE-3-Derivats pRMt25b (Marquardt, 1983; siehe auch Anhang) eingesetzt, welches in *E. coli* vermehrbar ist und in hohen Ausbeuten isoliert werden kann. Dieses besteht aus dem mit *Eco*RI linearisierten Vektor pBR322, in den das gesamte, durch partielle *Eco*RI Spaltung zwischen Fragment E3 und E5 linearisierte pBE-3 kloniert ist. Das

Abb. 4.1. -1:

Hybridisierung von pBE-3-
Restriktionsfragmenten mit

A: ^{32}P -RNA aus *M. clara* BE-3

B: ^{32}P -pBE-3

Spur 1: *Ava*I

2: *Hinc*II, *Pvu*I

(je 1,5 μg pBE-3 DNA)

Spur 3: *Eco*RI/*Ava*I

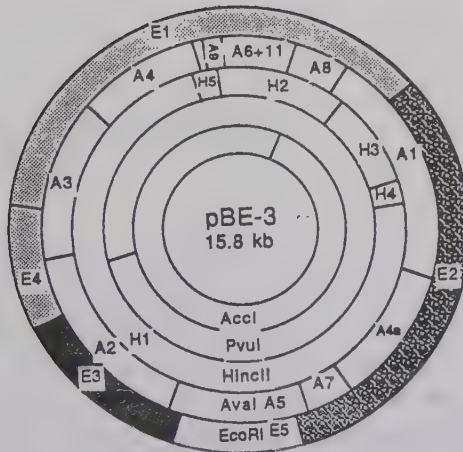
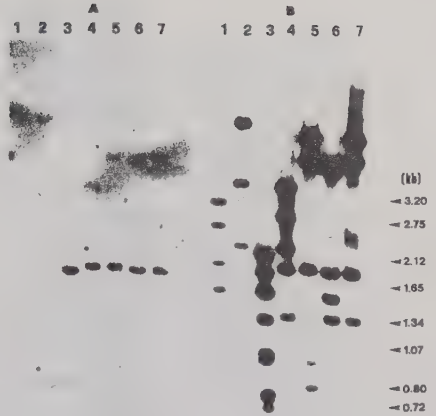
4: *Eco*RI/*Hinc*II

5: *Eco*RI/*Pvu*I

6: *Eco*RI/*Acc*I

7: *Eco*RI

(je 4 μg pRMt25b DNA)

Abb. 4.1. -2:

Restriktionskarte des Plasmids
pBE-3 mit eingezeichneten
Transkriptionsaktivitäten;

Dunkel: stark transkribiert;
Hell: schwach transkribiert;

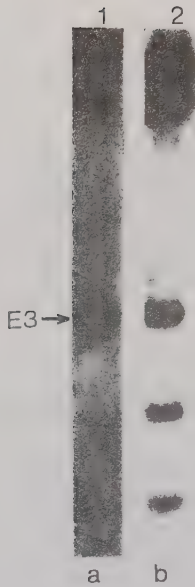


Abb. 4.1.-3:

Hybridisierung von 8 μ g
pRMt25b/*Eco*I Restriktions-
fragmenten mit

1: 32 P-RNA aus *M. clara* BE3

2: 32 P-pBE-3

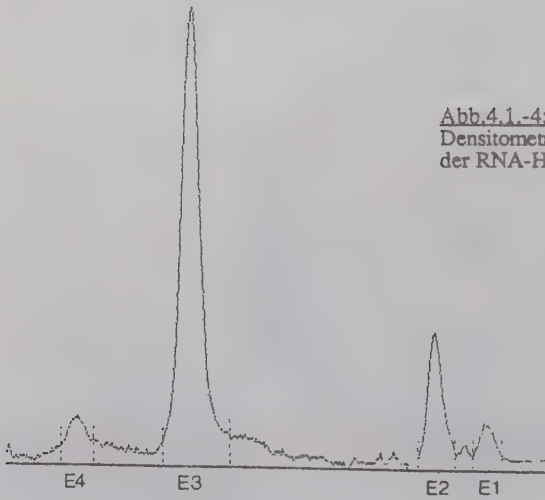


Abb.4.1.-4:

Densitometrische Auswertung
der RNA-Hybridisierung von Abb. 4.1. -3

bei Verdauung mit *EcoRI* jeweils herausgespaltene pBR322 diene als interne Negativ-Kontrolle.

Bei Spaltung von 4 µg pRMt25b mit *EcoRI/AvaI* hybridisierte gegen ³²P-RNA aus *M. clara* BE-3 das zweitgrößte Fragment sehr stark. Wie aus der Restriktionskarte ersichtlich, entspricht dieses dem durch *AvaI* verkürzten *EcoRI* Fragment 3 (abgekürzt E3). Bei Spaltung von *EcoRI/HincII*, *EcoRI/PvuI*, *EcoRI/AccI* und *EcoRI* hybridisierte ebenfalls das Fragment E3, welches für *HincII*, *PvuI* und *AccI* keine Erkennungsstelle besitzt, äußerst stark. Daneben trat bei Spaltung mit *EcoRI/HincII* eine um etwa eine Größenordnung schwächere Bande auf, die dem größten bei dieser Spaltung entstandenen Fragment entspricht und auf der Restriktionskarte im Bereich des E2 Fragmentes liegt. Die mit etwa der gleichen Intensität auftretende Bande bei Spaltung mit *EcoRI/PvuII*, *EcoRI/AccI* und *EcoRI* entspricht ebenfalls dem Fragment E2 (siehe Restriktionskarte, Abb. 4.1.-2).

Um die Nachweisgrenze dieser Methode auszutesten und auch die restlichen, offensichtlich relativ schwach transkribierten Bereiche des Plasmids auf Transkriptionsaktivität zu untersuchen, wurden ca. 8 µg pRMt25b DNA mit *EcoRI* gespalten, auf NC-Filter übertragen und mit ca. 25 µg RNA hybridisiert, welche mit 250 µCi γ-³²P-dATP markiert war (Abb.4.1.-3). Neben dem offensichtlich sehr stark transkribierten Fragment E3 und dem um etwa eine Größenordnung schwächer hybridisierenden Fragment E2 zeigten nun auch Fragment E1 sehr schwache und E4 gerade noch nachweisbare Hybridisierung bzw. Transkriptionsaktivität. Eine für Fragment E5 spezifische Bande trat auch nach mehrtägigem Exponieren nicht auf. Die den unterschiedlichen Hybridisierungsintensitäten entsprechenden Transkriptionsintensitäten wurden mit einem Densitometer ausgewertet (Abb.4.1.-4).

Transkription des Plasmids pBE-2

Das Plasmid pBE-3 stellt eine colineare Deletionsmutante des Stammpasmids pBE-2 dar (Marquardt, 1983). Dieses wurde in einem analogen Experiment untersucht, wobei vor allem von Interesse war, welche Transkriptionsaktivität der nicht auf dem pBE-3 Plasmid enthaltene Bereich aufweist.

Die aus einem von der Höchst AG zur Verfügung gestellten *M. clara* BE-2 Stamm isolierte Plasmid-DNA enthielt eine etwa 150 bp große Deletion im

EcoRI-Fragment 9 (E9), wodurch sich geringfügige Verschiebungen im Spaltmuster ergaben, welche jedoch für das hier durchgeführte Experiment ohne Bedeutung waren.

Ca. 6 µg pBE-2 DNA wurden jeweils mit den Enzymen *Bam*HI, *Ava*I, *Hinc*II und *Eco*RI gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf NC-Filter übertragen. Hybridisierung mit radioaktiv markierter Gesamt-RNA aus einem *M. clara* BE-2 Stamm mit intaktem Plasmid führte nach Autoradiographie (Abb. 4.1.-5) bei der *Bam*HI Spaltung zu einer einzigen Bande, die dem durch *Bam*HI linearisierten Plasmid entspricht. Die bei den übrigen Spaltungen jeweils auftretende Bande kann bei Verdau mit *Ava*I dem Fragment 7 (A7), mit *Eco*RI dem Fragment 9 (E9) und mit *Hinc*II dem Fragment (H1) zugeordnet werden. Die exakte Zuordnung der hybridisierenden Banden erfolgte wie im Fall der Transkriptionskartierung von pBE-3 durch Nachhybridisieren des NC-Filters mit radioaktiv markiertem pBE-2 Plasmid. Aus der Restriktionskarte von pBE-2 (Abb.4.1.-6) wird ersichtlich, daß diese Fragmente in einem Bereich liegen, der dem Fragment E9 entspricht, welches mit dem Fragment E3 von pBE-3 identisch ist. Sowohl auf pBE-2 als auch auf pBE-3 wird also der gleiche Bereich (E3 bzw.E9) um etwa eine Größenordnung stärker transkribiert als der übrige Teil des Plasmids.

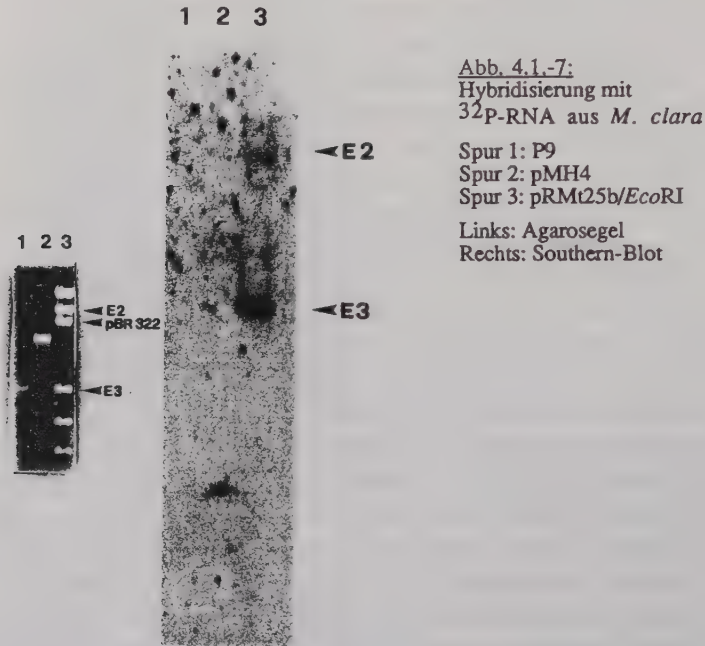
Neben dem stark transkribierten Fragment E9 (E3 von pBE-3) hybridisieren gerade noch erkennbar die Fragmente E3 (E2 von pBE-3) und E4 (auf pBE-3 nicht enthalten). Dies wird durch die Fragmente A6 und A3 bestätigt, wobei hier jedoch die Nachweisgrenze erreicht wird. Eine detailliertere Kartierung der Transkription des gesamten pBE-2 Plasmids war mit dieser Methode nicht möglich, da der Anteil der mRNA in der Gesamt-RNA von Bakterien nur einen geringen Anteil ausmacht und die Mengen an RNA und Plasmid-DNA nicht wesentlich gesteigert werden können.

Kontrollexperimente

Eine interne Kontrolle stellte bei pRMt25b Spaltungen stets der pBR322-Anteil dar, der in keinem Fall gegen radioaktiv markierte RNA aus *M. clara* hybridisierte.

Da bei Bakterien mRNA und rRNA nicht getrennt isoliert werden können, wurde die Möglichkeit einer unspezifischen Hybridisierung des GC-reichen Plasmids pBE-3 mit den GC-Clustern der rRNA durch folgende Kontrollexperimente ausgeschlossen:

Zwei extrem GC-reiche Plasmide, nämlich pMH4 (Rauschel, 1985) und der Klon P9 (erhalten von Dr. Kruczek) wurden neben pRMt25b/*EcoRI* nach Blotten gegen die radioaktive RNA-Probe hybridisiert, wobei nach Autoradiographie nur oben beschriebene pBE-3 Fragmente Banden ergaben, nicht aber die unspezifischen Plasmide (Abb. 4.1.-7).



In einem unter 4.8.3 beschriebenen Experiment konnte außerdem gezeigt werden, daß im Northern Blot radioaktiv markierte DNA des Fragments E3 (pBE-3) nicht gegen RNA des plasmidfreien Stammes *M. clara* BE-1, jedoch gegen RNA des plasmidhaltigen Stammes *M. clara* BE-3 hybridisiert. Die oben beschriebene Hybridisierung war also eindeutig spezifisch für plasmidabhängige RNA mit Plasmid-DNA.

4.1.2 Transkriptionsaktivität der Plasmide in *E. coli*

Da in *E. coli*- Stämmen, die das in pBR322 klonierte pBE-3 Plasmid enthielten (z.B. pRMt25b) keine pBE-3 spezifischen Proteine aufgefunden wurden (Marquardt, 1983), und andererseits *E. coli* Promotoren nicht oder nur äußerst schwach von *M. clara* Stämmen erkannt werden (Marquardt, persönliche Mitteilung), war es von Interesse, einen entsprechenden *E. coli* Stamm auf pBE-3 spezifische Transkription zu testen. Hierzu wurde aus dem Stamm *E.coli* HB101/pRMt25b Gesamt-RNA isoliert, radioaktiv markiert und gegen geblottete Restriktionsfragmente von pRMt25b hybridisiert (Abb. 4.1.-8a)

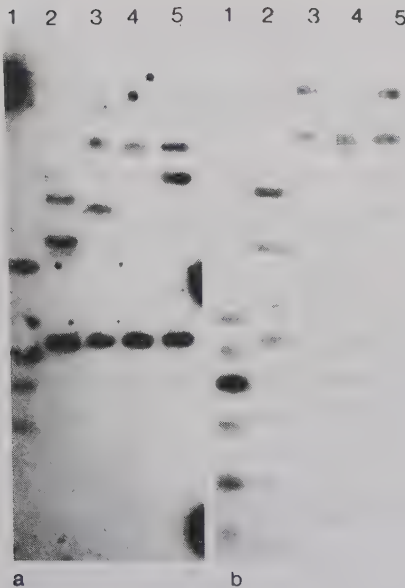


Abb. 4.1.-8:
Hybridisierung von
pRMt25b Restriktions-
fragmenten mit
a: ^{32}P -RNA aus
E. coli HB101/pRMt25b
b: ^{32}P -pBE-3

Spur 1: *EcoRI/AvaI*
2: *EcoRI/HincII*
3: *EcoRI/PvuI*
4: *EcoRI/AccI*
5: *EcoRI*

Die Spaltungen von pRMt25b wurden hierbei mit den Enzymen *EcoRI/AvaI*, *EcoRI/HincII*, *EcoRI/PvuI*, *EcoRI/AccI* und *EcoRI* durchgeführt, so daß aufgrund der jeweiligen *EcoRI* Spaltung die pBR322- und pBE-3- Anteile

nicht mehr verknüpft waren. Dadurch konnten nach Autoradiographie (Abb.4.1.-8a) die für pBE-3 Transkription spezifischen Banden von den für pBR322 spezifischen unterschieden werden. Durch erneute Hybridisierung des Filters mit ^{32}P -pBE-3, welches nicht mit pBR322 kreuzhybridisiert, konnten die pBE-3 spezifischen Banden der RNA-Hybridisierung erkannt und zugeordnet werden.

Neben den durch Transkription von pBR322 entstehenden Banden traten die gleichen pBE-3 Banden auf wie bei Hybridisierung mit RNA aus *M. clara* Stämmen. Außer dem auch in *E. coli* hoch transkribierten Fragment E3 wird auch das Fragment E2 transkribiert, jedoch relativ zum Fragment E3 stärker als in *M. clara*, so daß der Unterschied der Transkriptionsaktivität von E3 und E2 in *E. coli* weniger drastisch ausfällt.

Gerade noch nachweisbar hybridisiert hier auch das *Eco*RI Fragment 1 (E1), welches in *M. clara* erst bei äußerst langem Exponieren beobachtet werden konnte.

Die bei den übrigen Spaltungen auftretenden Banden bestätigen diese Ergebnisse (vgl. Restriktionskarte Abb. 4.1-2).

E. coli erkennt also eindeutig Promotoren aus *M. clara*, zeichnet sich jedoch durch weniger signifikante Unterschiede in der Transkriptionsaktivität der einzelnen Promotoren aus. Die Stärke der *M. clara* Promotoren liegt in *E. coli* offensichtlich in der Größenordnung derjenigen von pBR322.

Die Möglichkeit, daß die in die *Eco*RI Stelle von pBR322 klonierte pBE-3 DNA vom P1 Promotor (Stüber & Bujard, 1981) des pBR322 Vektors aus transkribiert wurde, konnte durch die unter 4.3.3 beschriebene Kartierung des 5'-Endes der mRNA ausgeschlossen werden.

4.1.3 Untersuchung des Stammes *M. clara* BE-1 auf plasmidspezifische Transkription

Wie unter 4.7 näher beschrieben, enthält der plasmidfreie Stamm *M. clara* BE-1 große Anteile des pBE-2 bzw. pBE-3 Plasmids im Genom integriert. Um festzustellen, ob diese plasmidhomologen Bereiche transkribiert werden, wurde RNA aus dem Stamm *M. clara* BE-1 isoliert und im Northern-Blot analysiert. Im Gegensatz zu RNA aus den Stämmen *M. clara* BE-2 und BE-3 hybridisierte RNA aus dem Stamm BE-1 nicht gegen radioaktiv markiertes

Plasmid pBE-3. Diese bereits in der Diplomarbeit durchgeführten Versuche wurden nochmals mit isoliertem und radioaktiv markiertem Fragment E3 wiederholt und ergaben dasselbe Resultat.

Möglicherweise sind die plasmidhomologen Bereiche im Genom des Stammes *M. clara* BE-1 generell transkriptionsinaktiv oder werden durch bestimmte Wachstumsbedingungen erst induziert. Beispielsweise könnten bestimmte Gene für Antibiotika-Resistenz (vgl. 4.10) erst unter Selektionsdruck transkribiert werden.

4.2 Charakterisierung des hochtranskribierten Bereiches (Fragment E3)

Eine detailliertere Kartierung des hochtranskribierten Bereichs und der entsprechenden Transkriptionselemente schien vor allem auch im Hinblick auf die Entwicklung eines Expressionssystems in *M. clara* unter Verwendung des starken Promoters aus dem Fragments E3 von Interesse.

4.2.1 Transkriptionskartierung des Fragments E3

Zur genaueren Transkriptionskartierung des Fragments E3 (pBE-3) wurde das Plasmid pRM3 (Marquardt, 1983) verwendet, in welchem das Fragment E3 in die *EcoRI* Stelle von pBR322 kloniert ist. Aus einer parallel durchgeführten und unter 4.6 näher beschriebenen DNA Sequenzierung von Fragment E3 war bereits die Lage der drei *NotI* Schnittstellen bekannt. Da zwei *NotI* Fragmente (2a und 2b) fast identische Größe besitzen und elektrophoretisch nicht getrennt werden können, wurde pRM3 einmal mit *NotI* und einmal mit *EcoRI/NotI* gespalten. Da auf dem Vektor pBR322 keine Erkennungsstelle für *NotI* enthalten ist, bleiben bei Spaltung mit *NotI* die beiden Randfragmente mit dem pBR322 verknüpft, wodurch N2a von N2b getrennt werden kann (Abb. 4.2.-1).

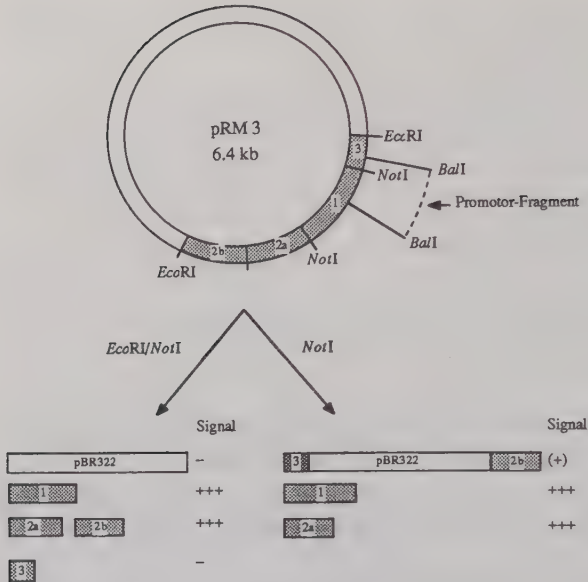


Abb. 4.2.-1: Schematische Darstellung der Transkriptionskartierung des Fragments E3 (pBE-3);
Offener Balken: pBR322; gepunkteter Balken: Fragment E3;

1 2

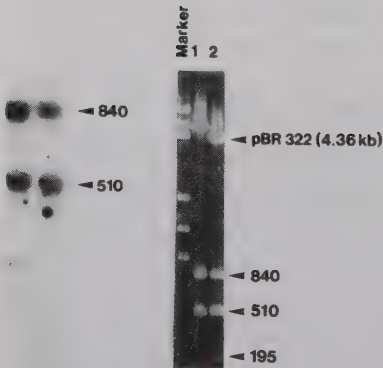


Abb. 4.2.-2:
Hybridisierung von 32 P-RNA aus
M. clara BE-3

Spur 1: pRM3/ *NotI*
2: pRM3/ *EcoRI/NotI*

Marker: pRMt25b/ *EcoRI*
(6,32; 4,95; 4,36;
2,05; 1,42; 1,04 kb)

links: Southern-Blot
rechts: Agarose-Gel

Nach Transfer auf NC-Filter wurde wiederum mit radioaktiv markierter RNA aus *M. clara* BE-3 hybridisiert. Dabei traten nach Autoradiographie (4.2.-2) nur die internen *NotI* Fragmente N1 und N2a als starke Banden auf, nicht jedoch die Randfragmente N2b und N3. Für N3 konnte dies bei der *EcoRI/NotI* Spaltung direkt beobachtet werden, für N2b aus der *NotI* Spaltung erschlossen werden, da das größte entstehende Fragment (pBR322 + N2b) nicht bzw. bei längerer Exponierung nur äußerst schwach hybridisiert.

Aus diesen Hybridisierungsdaten konnte geschlossen werden, daß nur die Fragmente N1 und N2a unter der Kontrolle eines starken Promotors stehen, während bei Fragment N2b nur sehr schwache und bei Fragment N3 entweder keine oder eine unter der Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegende Transkription stattfindet. Gleichzeitig ergab sich aus diesem Experiment, daß die starke Transkription nicht außerhalb von Fragment E3 gestartet werden kann und der entsprechende Promotor innerhalb des Fragments E3 liegen muß. Weiterhin konnte gefolgert werden, daß die Transkription entweder am Ende von N2a oder am Anfang von N2b terminiert wird.

4. 2. 2 Sequenzierung und Klonierung des Promotorbereichs

Da aus den Ergebnissen von 4.1.2 bekannt war, daß *M. clara* -Promotoren auch von *E. coli* erkannt werden, wurde angenommen, daß die Transkriptionselemente von *M. clara* in ihrer Struktur denen von *E. coli* ähneln und somit durch Vergleich mit bekannten *E. coli* Consensus-Sequenzen (Rosenberg & Court, 1979; Hawley & Mc Clure, 1983; Winnacker, 1987) aufgefunden werden könnten.

Wie unter 4.6.1 näher erläutert, wurde das hochtranskribierte Fragment E3 mit den Enzymen *MspI*, *TaqI*, *Sau3A*, *HaeIII* und *RsaI* gespalten. Die entstandenen Fragmente wurden nach Gelelektrophorese einzeln isoliert und in pUC12 subkloniert. Zugleich wurde das gesamte Fragment E3 aus dem Plasmid pRM3 in pUC12 umkloniert (pTME3), um mit den üblichen, pUC-spezifischen "universal" und "reverse" Primern ein Ansequenzieren vom rechten und linken Rand her zu ermöglichen. Bei der Sequenzierung des Plasmids pTME3 mit reversem Primer wurde bei Position 200-310 eine Sequenz aufgefunden, die hohe Homologie zur Consensus-Sequenz bakterieller Promotoren aufwies (Abb. 4.2.-3a und Tab.4.3.-1).

Es handelt sich hierbei um überlappende, divergierende Promotoren mit identischen Shine/Dalgarno-Sequenzen (SD). In beiden Promotoren sind sowohl in der "-10" Box (Schaller et al., 1975) und in der "-35" Region die in bakteriellen Promotoren hochkonservierten Basen enthalten.

Zur Klonierung dieser Promotoren wurde aus dem Plasmid pTME3 das Fragment E3 mit *EcoRI* herausgespalten und nach Isolierung mit *Sau3A* verdaut. Die hierbei entstandenen Fragmente wurden erneut isoliert und in die *BamHI* Stelle von pUC12 kloniert. Eine Sequenzanalyse (Abb. 4.2.-3b) der hierbei erhaltenen Subklone pTM13 und pTM28 ergab, daß diese den entsprechenden Promotorbereich enthielten, wodurch nun einerseits die Sequenz abgesichert war und andererseits die Promotoren auf diesen Subklonen zur Verfügung standen (pTM13: 285 bp). Abb. 4.2.-4 zeigt die Struktur von pTM13 sowie die Lage der beiden Promotoren.

Die Tatsache, daß *E. coli* die Promotoren aus *M. clara* erkennt, eröffnete auch die Möglichkeit einer alternativen Methode der Promotorsuche mittels eines sog. "Promotor-probe"-Plasmids, welche in Zusammenarbeit mit Dr. Marquardt von der Höchst AG/Frankfurt durchgeführt wurde. Hierbei wurde der Vektor pKK231-1 (Brosius, 1984) verwendet, dem der Promotor vor dem Gen für die Resistenz gegen Chloramphenicol (CAT) fehlt. Spaltung von pBE-3 mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen und sog. "shot gun"-Klonierung der entstandenen Fragmente in den Polylinker vor dem CAT-Resistenzgen führte zur Isolierung des Klons R9, welcher in hohem Maße gegen Chloramphenicol resistent war. Dieser, von Dr. Marquardt zur Verfügung gestellte Klon (in Abb. 4.2.-1 als "Promotorfragment" bezeichnet), wurde ebenfalls sequenziert und war in den überlappenden Bereichen mit den Klonen pTM13 bzw. pTM28 identisch. In zwei unterschiedlichen Ansätzen konnte also ein- und derselbe Promotor identifiziert und sequenziert werden, welcher für die hohe Transkription des Fragments E3 verantwortlich ist. Gleichzeitig wurden dadurch die Hybridisierungsexperimente indirekt bestätigt.

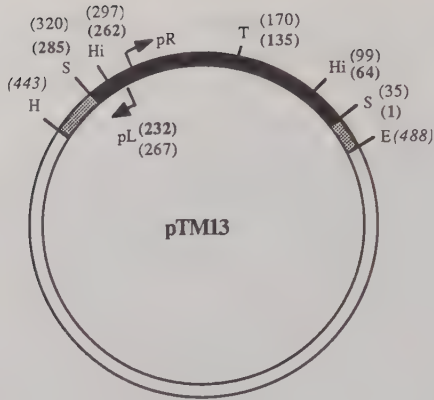


Abb. 4.2.-4:

Struktur des Promotorklons pTM13;

Offener Balken: pUC12; gepunktet: Polylinker; schwarz: Insert mit Promotoren (*Sau3A* Fragment aus Fragment E3)

H: *HindIII*; Hi: *HinfI*; S: *Sau3A*; T: *TaqI*; E: *EcoRI*;

Zahlen in Kursiv-Druck: Positionen von pUC12;

Normal-Druck: Positionen bzgl. der Gesamtsequenz von E3;

Fett-Druck: Positionen bzgl. pTM13-Insert;

4.3 Analyse des Promotorbereichs

4.3.1 Vergleich der Aktivität beider Promotoren

Wie unter 4.2.1 und 4.1.1 beschrieben, hybridisierte weder das *NotI*-Fragment N3 aus E3 noch das Fragment E5 gegen radioaktiv markierte RNA aus *M. clara* BE-3. Daraus konnte geschlossen werden, daß der auf der Restriktionskarte von pBE-3 nach rechts weisende und aus dem Fragment E3 in Richtung auf Fragment E5 transkribierende Promotor (PR) entweder eine äußerst schwache, unter der Nachweisgrenze liegende Aktivität besitzt, oder völlig abgeschaltet ist. Dies wurde auch durch die von Dr. Marquardt durchgeführten Versuche mit dem "Promotor-probe" Plasmid pKK231-1 bestätigt. Es konnten hierbei keine gegen Chloramphenicol resistenten Klone erhalten werden, bei denen das CAT-Gen unter der Kontrolle des pR-

Promotors stand. In allen resistenten Klonen war das einklonierte Fragment so orientiert, daß die Transkription des CAT-Gens vom Promotor pL ausging.

Offensichtlich handelt es sich bei den hier isolierten Promotoren um ein hoch reguliertes System, bei dem unter "normalen" Bedingungen der Promotor pL äußerst aktiv, der Promotor pR hingegen abgeschaltet ist.

4.3.2 Vergleich der Struktur beider Promotoren und Homologie zu *E.coli* Promotoren

Bei Promotor pR liegen je zwei "-35" und "-10" Regionen direkt hintereinander (pRa und pRb), wobei beiden "-10" Boxen im Abstand von 7 Basen ein Adenosin-Nukleotid als potentieller Transkriptionsstart folgt (Abb. 4.2.-3a).

Eine Analyse der Sequenzdaten ergibt weiterhin, daß alle Promotoren sowohl in der "-10" Box als auch in der "-35" Region die bei fast allen bakteriellen Promotoren hochkonservierten Nukleotide enthalten. So ist beim Promotor pL in der "-10" Box (5'-TAAAAT-3') nur eine schwach konservierte Base gegenüber der Consensus-Sequenz (5'-TATAAT-3') ausgetauscht. Die entsprechende Sequenz des Promotors pRa (5'-TATGTT-3') ist mit derjenigen des lacZ Promotors von *E.coli* identisch. In allen Promotoren sind die ersten drei hochkonservierten Basen der "-35" Consensus-Sequenz (5'-TTGACA-3') enthalten (5'-TTGGTT-3' für pRa, 5'-TTGTGT-3' für pRb; 5'-TTGCGT-3' für pL). Ein äußerst auffallendes Merkmal stellen die TG- bzw. AC-Blöcke zwischen den "-35" und "-10" Regionen dar (Abb. 4.2.-3a). In den Promotoren pRa und pL beträgt der Abstand zwischen diesen Boxen jeweils 16 Basen, bei Promotor pRb 19 Basen. Es wird angenommen, daß dieser Abstand, welcher bei den meisten der bisher untersuchten Promotoren zwischen 15 und 19 Basen beträgt (Moran et al., 1982), die Promotorstärke beeinflussen könnte. Bei einem Abstand von 19 Basen dürfte es sich eher um einen schwachen Promotor handeln (Peschke et al., 1985).

Eine AT-reiche Region (Bujard, 1980; Tatsurani, 1986), welche bei vielen starken *E.coli* Promotoren zu finden ist, ist bei den hier isolierten *M. clara* Promotoren nicht vorhanden.

In der dem Promotor pL folgenden Sequenz findet sich bei Position +39, bezogen auf den Transkriptionsstart, ein potentielles Startcodon (ATG). Beim

Promotor pR findet sich dieses bei Position +42. Jeweils vor diesen Startcodons weisen beide Promotoren die Sequenz 5'GAAG3' auf, welche eine ribosomale Bindungsstelle (RBS) darstellt (Shine & Dalgarno, 1974). Diese auch als Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) bezeichnete Nukleotidabfolge ist im Fall der *M. clara* Promotoren identisch mit derjenigen des "linken Promotors" aus dem Bakteriophagen λ (λ pL). Die einzelnen Promotorelemente sind in Tab. 4.3.-1 zusammengefaßt.

	" -35"	" -10"	S/D
<i>M. clara</i> pRa	5' TTGGTT	TATGTT	GAAG 3'
<i>M. clara</i> pRb	TTGTGT	TATTTT	
<i>M. clara</i> pL	TTGCGT	TAAAAT	GAAGG
Consensus (<i>E. coli</i>)	TTGACA	TATAAT	(GA)A GG

Tab. 4.3.-1

Übersicht über die Promotorelemente pL/pR aus dem *M. clara* Plasmid pBE-3 (Fragment E3). Buchstaben in Fettdruck stehen für hochkonservierte Basen in der *E. coli* Consensus-Sequenz.

4.3.3 Bestimmung des Transkriptionsstarts auf Fragment E3

Um eindeutig zu zeigen, daß die starke Transkription des Fragments E3 von dem durch Sequenzvergleich mit anderen bakteriellen Promotoren aufgefundenen Promotor pL ausgeht, war es erforderlich, die Startstelle der Transkription zu ermitteln bzw. das 5'-Ende der E3 spezifischen mRNA zu bestimmen. Hierzu wurden zwei Verfahren angewandt, das sog. "S1 mapping" (Berk & Sharp, 1977; Favoloro et al., 1980; Weaver & Weissmann, 1979) und die "Primer Extension"- Reaktion.

-S1 mapping

Aus dem Klon pTM13 wurde durch Doppelspaltung mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII* das den Promotorbereich enthaltende Insert herausgeschnitten, welches nach Isolierung durch Elektroelution mit dem Enzym *Sau3A* nachgespalten wurde. Das so erhaltene Fragmentgemisch (das vom Polylinker

abgespaltene Fragment wurde nicht erneut isoliert) wurde anschließend mit T4-Kinase an den 5'-Enden radioaktiv markiert.

Die Hybridisierungstemperatur für RNA und DNA wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,5\% \text{ GC} + 16,6 \log (\text{Na}^+) - 0,6\% \text{ Formamid}$$

Für das verwendete *Sau3A*-Promotorfragment mit einem GC-Gehalt von 61,2% ergab sich für die Hybridisierung in 70% Formamid (3.3.6) eine Schmelztemperatur von etwa 61 °C. Da diese Formel lediglich eine Näherung darstellt und eigentlich für DNA-DNA Hybridisierung gilt, wurde die geeignetste Hybridisierungstemperatur empirisch ermittelt (Maniatis et al., 1982; Casey & Davidson, 1977).

Die Hybridisierungen wurden bei 58 °C, 62 °C und 66 °C mit je 100 µg RNA aus dem Stamm *M. clara* BE-3 und 1 µg radioaktivem Fragment durchgeführt. Nach Hybridisierung wurde mit S1 Nuklease behandelt und die entstandenen Produkte auf einem 0,8% Sequenzgel aufgetrennt. Wie aus der Autoradiographie (Abb. 4.3.-1) hervorgeht, traten nur bei demjenigen Ansatz drei relativ schwache Banden auf, welcher bei 58 °C hybridisiert worden war. Diese entsprechen einer Größe von 56, 57 und 58 Basen. Als Marker diente eine DNase-Leiter des radioaktiv markierten Fragmentgemisches, wobei der durch die *Sau3A*-Spaltung entstehende Polylinkeranteil (*Sau3A* bzw. *Bam*HI bis *Hind*III: 27 Basen) als Bezugspunkt diente. (Da es sich um ein denaturierendes Gel handelt, wird die 27 bp große Markerbande wegen der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit der Stränge und der beidseitigen 5'-Markierung in eine Doppelbande aufgespalten). Daß im Bereich von 57 Basen drei Banden statt einer auftraten, ist vermutlich in der mangelnden Spezifität der S1 Nuklease zu sehen, die bekanntlich häufig 1-2 Nukleotide vom Doppelstrang abbaut.

Der aufgrund des gebildeten DNA/RNA-Hybrids doppelsträngige und somit geschützte Bereich ist also etwa 57 bp lang. Das 5' Ende der mRNA befindet sich daher ca. 57 Basen von der *Sau3A* Schnittstelle entfernt, also etwa 8 Basen nach der Pribnow-Schaller Box des Promotors pL (siehe Abb.4.2.-3a). Auf eine weitere Optimierung des Verfahrens und einseitige 5'-Markierung des Fragments wurde verzichtet, da zu diesem Zeitpunkt das Oligonukleotid OTM5 zur Verfügung stand, und das unten beschriebene "Primer extension"-Verfahren wesentlich genauere Ergebnisse lieferte.

Primer extension

Um eine genauere Bestimmung des Transkriptionsstarts zu ermöglichen, wurde das "Primer-extension"-Verfahren (Elion & Warner, 1984) angewandt. Als Primer diente das 31 Basen lange Oligonukleotid OTM5, welches von Dr. Mertz synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

Sequenz von OTM5: 5'-GATCGCTTCGCTTGCCATGTCAGACTCCTTC-3'

Wie aus der Sequenz zu ersehen ist, wurde das Oligonukleotid OTM5 so gewählt, daß es mit dem "oberen" Strang in Abb. 4.2.3a der dem Promotor pL folgenden, stromabwärts liegenden Sequenz von Fragment E3 identisch ist, also dem kodierenden Strang und damit der gebildeten mRNA komplementär ist.

Da zu diesem Zeitpunkt bereits ein großer Teil des Fragments E3 sequenziert war, konnte durch eine Computeranalyse sichergestellt werden, daß das Oligonukleotid OTM5 keine weiteren Homologien zur Sequenz von E3 besitzt, welche zu unspezifischem "Priming" führen könnten. Nach Hybridisierung von radioaktiv markiertem OTM5 an RNA aus den Stämmen *M. clara* BE-3 und *E.coli* HB101/pRMt25b wurde mit AMV-Reverser-Transkriptase unter Zugabe der entsprechenden Nukleotide vom freien 3'OH des Primers (OTM5) ausgehend, die für das Fragment E3 spezifische mRNA bis zu ihrem 5'Ende in den entsprechenden, komplementären DNA-Strang übersetzt. Die Größe der entstandenen Produkte wurde auf einem denaturierenden Sequenzgel mit Hilfe eines radioaktiven Markers (pBR322/AluI) bestimmt (Abb. 4.3.-2). Das Hauptprodukt war sowohl in *M. clara* BE-3 als auch in *E.coli* HB101/pRMt25b 57 Basen lang, woraus sich als Startstelle der mRNA das in Abb.4.2.-3a mit +1 bezeichnete Adenosin Nukleotid ergibt. Zwischen diesem und dem letzten Nukleotid (Thymidin) der Pribnow-Schaller-Box liegen 7 Basen. Sowohl ein Adenosin-Nukleotid als auch ein Abstand von 5-9 Basen wird bei den meisten bakteriellen Promotoren als Transkriptionsstart beobachtet.

Aus dem Auftreten eines weiteren, schwächeren Extensions-Produkts von 47 Basen Größe kann gefolgert werden, daß die mRNA in *E.coli* wie auch in

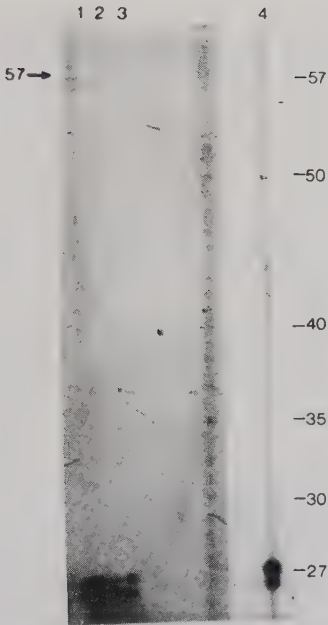


Abb. 4.3.-1:

S1-Analyse des Promotors pL

Spur 1: Hybr.-Temp.: 58 °C

2: — " — : 62 °C

3: — " — : 66 °C

4: Marker (DNase-Leiter)

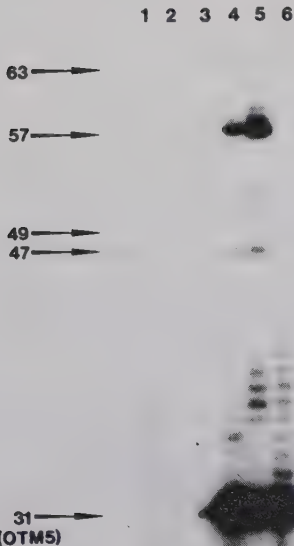


Abb. 4.3. -2:

"Primer extension" Analyse des Promotors pL

Spur: 1+2: Marker (pBR322/*AluI*)

3: OTM5 (Primer)

4: "Primer extension" Reaktion mit RNA aus *M. clara* BE-35: "Primer extension" Reaktion mit RNA aus *E. coli* HB101/pRMt25b

6: Kontroll-Reaktion mit Hefe-tRNA

M. clara zu etwa 10% auch bei dem in Abb.4.2.-3a bei +11 liegenden Adenosin-Nukleotid gestartet wird. Interessanterweise findet sich in *E.coli* HB101/pRMt25b, nicht aber in *M. clara* BE-3 eine zusätzliche Startstelle bei Adenosin-Nukleotid an Position +6 (Extensions-Produkt von 52 Basen Länge). Als Kontrolle wurde die Reaktion auch mit Hefe-tRNA durchgeführt, wobei keine entsprechenden Signale auftraten.

Das "Primer-extension"-Experiment bestätigte und erweiterte somit das Ergebnis des S1-mapping und bewies, daß der durch Vergleich mit der Consensus Sequenz bakterieller Promotoren aufgefundene Promotor pL sowohl in *E.coli* als auch in *M. clara* für die Transkription des Fragments E3 verantwortlich ist. Die bevorzugte Startstelle der Transkription (hier als +1 bezeichnet) entspricht der Position 267 in der in Abb.4.6-2 dargestellten Gesamtsequenz von Fragment E3.

4.3.4 Mögliche Sekundärstruktur und energetische Berechnung

Analysiert man die Sequenz des Promotorbereichs hinsichtlich umgekehrter Repetitionen, so findet man zwischen dem AC- und dem GT-Block zahlreiche Möglichkeiten, die zur Bildung von "Loop-Strukturen" führen könnten. Eine mögliche Sekundärstruktur, bei welcher der Stamm aus 11 bzw. 12 gepaarten Basen ohne Fehlpaarung besteht, ist in Abb.4.3.-3 gezeigt. Hierbei wurde das AT-Paar am Ende des Stamms nicht eingezeichnet, da ein GC-Basenpaar das Ende des Stamms besser stabilisieren kann.

Die hier dargestellte Sekundärstruktur wurde energetisch mit dem Beckman Microgenie™ Programm (Queen & Korn, 1984) berechnet, welchem die Regeln von Tinoco et al. (1973) zu Grunde liegen. Danach liefert die Bildung dieser Struktur eine freie Energie von -12,2 kcal/mol.

Die in Abb.4.3.-3 dargestellte Sekundärstruktur ist nur eine von mehreren Möglichkeiten. Beispielsweise können die im Loop durch Pfeile gekennzeichneten invertierten Repetitionen ebenfalls miteinander basenpaaren. Unmittelbar nach der Shine-Dalgarno-Sequenz des Promotors pR findet sich eine weitere umgekehrte Repetition (5'-CCGGCCGG-3'), welche möglicherweise als Bindungsstelle für ein DNA-bindendes Protein (Repressor etc.) dienen könnte.

Ob eine dieser umgekehrten Repetitionen *in vivo* als Sekundärstruktur vorliegt, wurde nicht weiter untersucht.

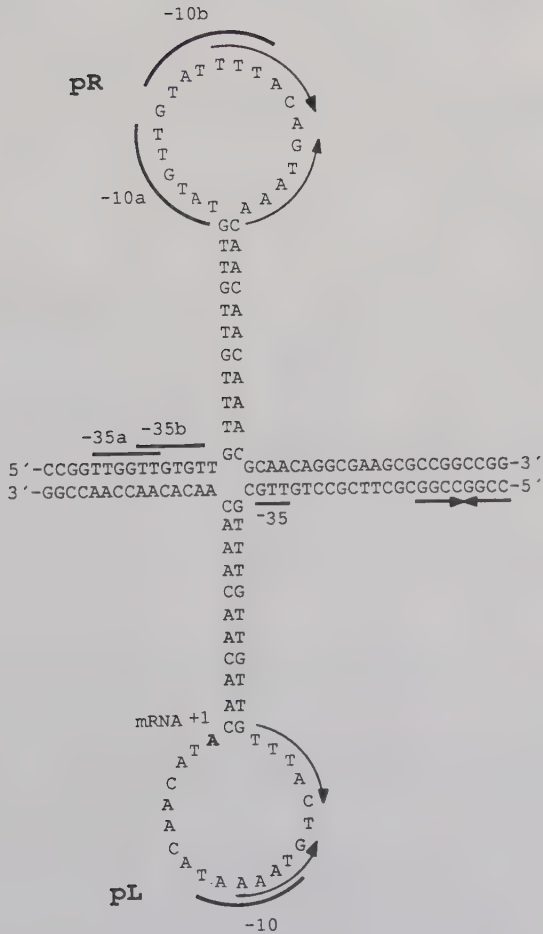


Abb. 4.3.-3:

Mögliche Sekundärstruktur der Promotorregion pR/pL;
Pfeile markieren umgekehrte Repetitionen;
Balken kennzeichnen -35 und -10 Regionen

4.4 Expression von IL-2 in *M. clara* BE-1 unter Verwendung des Promotors pL

Der Stamm *M. clara* zeichnet sich gegenüber anderen Mikroorganismen, wie beispielsweise *E. coli*, durch niedrige Fermentationskosten (Methanol als einzige C-Quelle) und höhere biologische Sicherheit (strikte Methanolabhängigkeit) aus. Diese Vorteile können in der Verwendung von *M. clara* als Expressionssystem für Fremdprotein ausgenutzt werden.

Promotoren aus *E. coli* werden jedoch in *M. clara* nicht oder nur äußerst schwach erkannt (Dr. Marquardt, persönliche Mitteilung). Mit dem isolierten Promotor pL aus dem Plasmid pBE-3 stand nun ein starker und in *M. clara* aktiver Promotor zur Verfügung, der als Ausgangspunkt zur Entwicklung eines Expressionssystems verwendet wurde.

Als Modellsystem wurde in Zusammenarbeit mit der HöchstAG/Frankfurt die Expression des humanen IL-2 Gens (Taniguchi et al., 1983) gewählt, welches auch biotechnologisch von Bedeutung ist.

4.4.1 Klonierung des Expressionsvektors pTM-IL-2

Zur Expression von Interleukin 2 (IL-2) in *M. clara* BE-1 mußte der Promotor pL derart mit dem IL-2 Gen verknüpft werden, daß kein Fusionsprotein entsteht, da dieses biologisch wohl nicht aktiv wäre (Dr. Mertz, persönliche Mitteilung). Auf das erste Startcodon stromabwärts vom Promotor pL sollte also unmittelbar die kodierende Region des IL-2 Gens folgen. Daneben schien es wünschenswert, bis zu diesem Startcodon möglichst die ursprüngliche Sequenz aus dem Promotorbereich von *M. clara*, insbesondere die für eine effiziente Expression entscheidende Shine-Dalgarno-Sequenz zu verwenden, um das System möglichst wenig zu beeinträchtigen.

Die gewählte Klonierungsstrategie ist in Abb. 4.4.-1 dargestellt. Hierbei wurde das aus dem Promotorklon pTM13 mittels entsprechender Restriktionsenzyme herausgespaltene Promotorfragment mit einem aus dem Klon pUC12/Psr^I

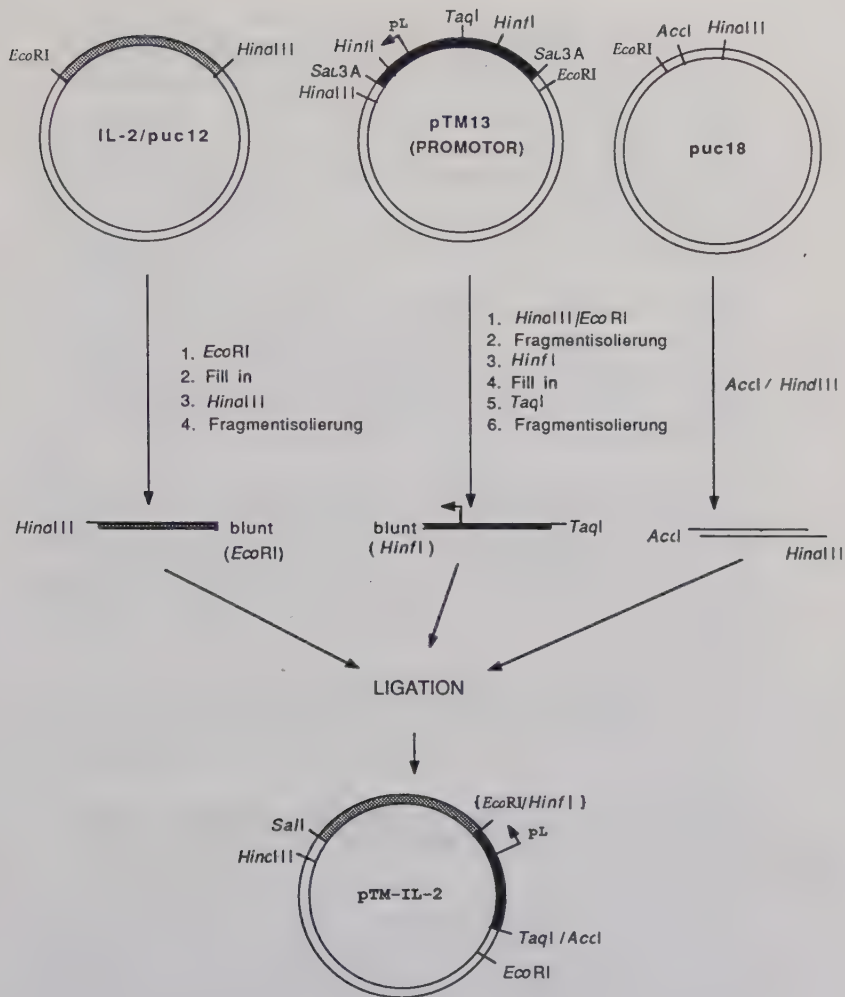


Abb. 4.4.-1: Strategie zur Klonierung des IL-2 Expressionsvektors pTM-IL-2;
 Balken gepunktet: IL-2 Gen; schwarz: Promotorfragment mit Promotor pL; offen: pUC12-Vektor;

isolierten IL-2 Gen derart fusioniert, daß die SD-Sequenz des *M. clara* pL-Promotors erhalten blieb, und der Abstand der SD-Sequenz zum Startcodon (ATG) des IL-2 Gens ebenso groß war wie derjenige zum ursprünglichen Startcodon (ATG) bei *M. clara*. Dieses Konstrukt wurde dann in einen pUC18-Vektor eingesetzt, so daß das Promotor-Interleukin-Fragment in einer "Kassette" (cartridge) vorliegt und über die im pUC12/pUC18-Polylinkeranteil enthaltenen Schnittstellen leicht herausgespalten und in verschiedene Konjugationsvektoren zum Transfer nach *M. clara* kloniert werden kann. Die Verwendung eines pUC-Vektors ermöglichte es auch, das fertige Konstrukt mit Hilfe eines üblichen pUC-spezifischen Primers direkt aus dem Plasmid zu sequenzieren und somit die Sequenz der Fusionsstelle zu bestätigen. Die Klonierung des Expressionsvektors ist nachfolgend im Detail beschrieben.

IL-2-Gen

Zur Klonierung wurde das IL-2 Gen aus dem Klon pUC12/IL-2-Pst⁻ verwendet, welcher freundlicherweise von Dr. Mertz zur Verfügung gestellt wurde. (Im pUC12-Polylinker ist die PstI-Schnittstelle mutagenisiert). Dem verwendeten IL-2 Gen, welches entsprechend einer optimierten "Codon Usage" durch chemische DNA-Synthese hergestellt wurde (Engels et al., 1985; Winnacker, 1987), fehlt die Präsequenz von 57 bp. Trotz dieser fehlenden Präsequenz ist das verwendete IL-2-Gen jedoch biologisch aktiv (pers. Mitteilung, Dr. Mertz). Die verwendete IL-2-Sequenz ist im Anhang enthalten.

Durch Spaltung der pUC12/IL-2-Pst⁻ DNA mit EcoRI (Erkennungsstelle im Polylinker von pUC12) und anschließendes Auffüllen der überhängenden Enden wurde ein lineares Molekül erzeugt. Nach Entfernung der Klenow Polymerase durch mehrmaliges Phenolisieren wurde das IL-2-Gen (408 bp) mit HindIII (Erkennungsstelle im Polylinker) herausgespalten und mit der DEAE-Membranfiltertechnik isoliert. Das dadurch entstandene, in Abb. 4.4.-2 gezeigte Fragment besitzt somit eine aufgefüllte EcoRI-Stelle unmittelbar vor dem ATG-Startcodon und eine HindIII-Stelle mit überhängendem 5'-Ende nach den Stopcodons TGA-TAA.

Wie aus Abb. 4.4.-1 ersichtlich, wird bei der Ligierung das IL-2 Gen über die *Hind*III-Schnittstelle des dem IL-2 Gen folgenden Polylinkers aus pUC12 mit der *Hind*III-Schnittstelle des Vektors pUC18 verknüpft und das glatte Ende mit dem ebenfalls glatten Ende des Promotorfragments ligiert. Die Sequenz der hierbei entstehenden Fusion ist in Abb. 4.4.-4a dargestellt. Durch die Klonierung wurde der ursprünglich in *M. clara* vorhandene Abstand der SD-Sequenz zum Startcodon (8 bp) erhalten. Der durch die Klonierung bedingte Austausch von 4 Basenpaaren zwischen der SD-Sequenz und dem Startcodon sollte keinen wesentlichen Einfluß auf die Effizienz der Expression haben.

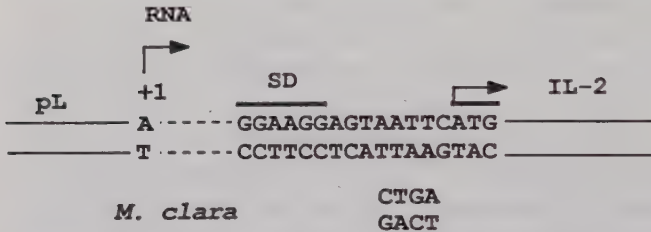


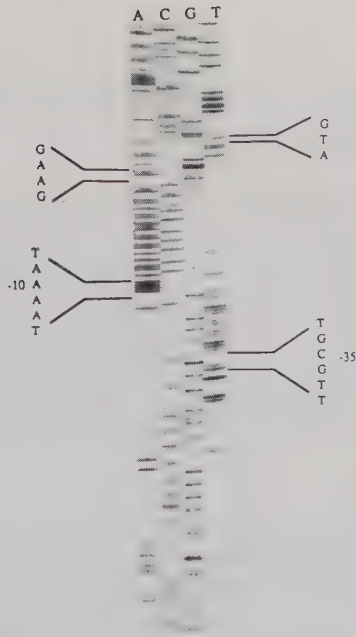
Abb. 4.4.-4a: Sequenz der Fusion von Promotor pL und IL-2 Gen

Da das Promotorfragment am anderen Ende eine *Taq*I-Schnittstelle besitzt, welche mit der *Acc*I-Schnittstelle des Vektors pUC18 kompatibel ist, wird bei der Ligierung ein zirkuläres Molekül erzeugt, aus welchem durch die im Polylinker von pUC12 bzw. pUC18 vorhandenen singulären Schnittstellen die Promotor-Interleukin-Fusion leicht herausgespalten und in diverse Konjugationsvektoren kloniert werden kann, um den Transfer nach *M. clara* BE-1 zu erreichen (*M. clara* Stämme lassen sich nicht durch herkömmliche Techniken transformieren). Als geeignet erwiesen sich hierbei die Enzyme *Eco*RI und *Sal*I, welche auf dem gesamten Konstrukt singulär sind. (Die interne, aufgefüllte *Eco*RI-Schnittstelle, welche mit der ebenfalls aufgefüllten *Hin*fI-Schnittstelle fusioniert ist, wird nicht regeneriert).

Durch DNA-Sequenzierung konnte mit universal-Primer über den Promotorbereich in das IL-2 Gen hineinsequenziert und die Korrektheit der klonierten Fusionsstelle überprüft werden (Abb. 4.4.-4b).

Abb. 4.4.-4b:

DNA-Sequenz der Fusion von Promotor pL und IL-2 Gen im Expressionsvektor pTM-IL-2



4.4.2 Nachweis der IL-2 Expression

Der oben beschriebene Expressionsvektor pTM-IL-2 wurde von Dr. Marquardt (Höchst AG/Frankfurt) in verschiedene "shuttle"-Vektoren umkloniert, welche über Konjugation den Transfer nach *M. clara* ermöglichten. Die anschließend zur Verfügung gestellten Klone wurden im Western Blot analysiert (siehe 3.8). Zwar tritt bei einigen dieser Klone bei Hybridisierung mit dem IL-2 Antikörper EC10 (Überstand) aus Maus eine Bande auf, welche der Größe des IL-2 Proteins entspricht, doch ist eine eindeutige Aussage noch nicht möglich, da der verwendete Antikörper starke Kreuzhybridisierung mit anderen Proteinen aus *M. clara* zeigte. Das in Höhe der IL-2 Bande auftretende Signal der *M. clara* Stämme entspricht in der Intensität etwa 1/20-1/40 desjenigen des unter Kontrolle des tac-Promotors in *E. coli* exprimierten IL-2 Proteins (Positiv-Kontrolle: tac-IL-2/*E. coli*). Weitere Western Blot Analysen mit einem bei der Firma "Genzyme-Corporation" erhältlichen, hochspezifischen, monoklonalen IL-2 Antikörper und Variation verschiedener Parameter (siehe 5.3) werden näheren Aufschluß geben über die Effizienz der Expression in *M. clara*.

4.5 Klonierung eines β -Galaktosidase-Expressionsvektors unter Verwendung des Promotors pL

Als Alternative zur Expression von IL-2 in *M. clara* wurde ein β -Galaktosidase Expressionsvektor (pTM-GAL) kloniert. Im Gegensatz zu IL-2 ist β -Galaktosidase auch als Fusionsprotein biologisch aktiv (Bassford et al., 1978; Heidecker & Müller-Hill, 1977).

Als Promotorfragment diente wiederum das *EcoRI/HindIII*-Fragment aus pTM13 (vgl. 4.4.1), welches nach Isolierung mit *Sau3A* nachgespalten wurde. Die hierbei entstandenen, überhängenden Enden des Fragments wurden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt (Abb. 4.5.-1).

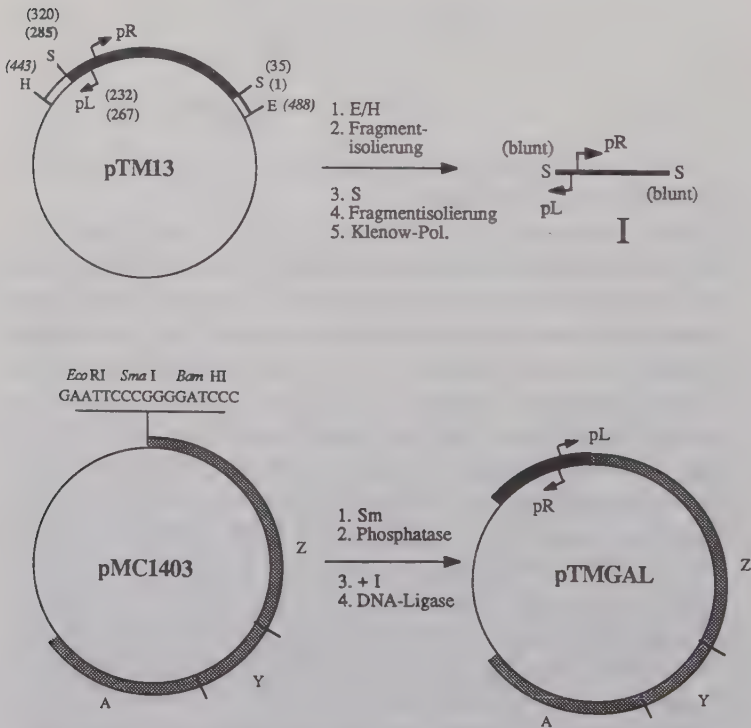


Abb. 4.5.-1: Strategie zur Klonierung von pTMGAL;
E: *EcoRI*; S: *Sau3A*; H: *HindIII*; Sm: *SmaI*;
Positionen von pTM13 siehe Abb. 4.2.-4;
(Erläuterungen siehe Text)

Als β -Galaktosidase-Vektor wurde das Plasmid pMC1403 (Casadaban et al., 1980) verwendet, in welchem der Promotor des lacZ-Gens fehlt. Da außerdem die ersten 7 Codons der β -Galaktosidase durch einen Polylinker mit den Schnittstellen *Bam*HI, *Sma*I und *Eco*RI ersetzt sind, ist pMC1403 zur Expression von β -Galaktosidase-Fusionsproteinen unter der Kontrolle eines einklonierten Promotors und zur Bestimmung der Translationseffizienz der entsprechenden Elemente geeignet. Durch Messung der β -Galaktosidase-Aktivität (Hydrolyse von o-Nitrophenyl- β -Galaktopyranosid) kann auf einfache Weise die Stärke des Promotors bzw. der Expression bestimmt werden (Horiuchi et al., 1962). Der Vektor pMC1403 enthält hinter dem lacZ Gen auch das lacY Gen (Permease) und das lacA Gen (Transacetylase), wodurch die zur "weiß/blau"-Selektion in *M. clara* benötigte Aufnahme von β -Galaktosidase begünstigt werden sollte (Büchel et al., 1980).

Durch Spaltung mit *Sma*I und anschließender Phosphatase-Behandlung wurde der Vektor linearisiert und mittels T4-Ligase mit dem Promotorfragment verknüpft, welches außer dem Startcodon (ATG) noch weitere sechs Aminosäuren des Fragments E3 aus dem *M. clara* Plasmid pBE-3 enthält. Aus Abb. 4.5.-2 wird ersichtlich, daß hierbei der Leserahmen erhalten bleibt. Das Promotorfragment kann zwar in beiden möglichen Orientierungen in den Vektor ligiert werden, doch sollten nur diejenigen Klone auf x-Gal haltigen Agarplatten blaue Kolonien ergeben, bei welchen das lacZ Gen unter der Kontrolle des aktiven Promotors pL steht.

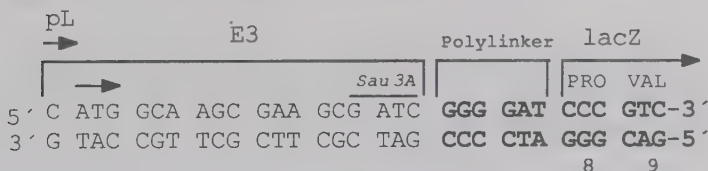


Abb. 4.5.-2:

Abb. 4.3.2.

DNA-Sequenz der Fusion von Promotor pL und lacZ Gen im Expressionsvektor pTMGAL

Das ligierte Konstrukt wurde in kompetente Bakterien des Stammes *E. coli* MC1061 (Casadaban et al., 1980) transformiert, in welchem das Lactose-Operon deletiert ist ($\Delta(\text{lacIPOZY})\text{X74}$). Auf x-Gal haltigen Agarplatten wurde auf β -Galaktosidase produzierende Kolonien (Blaufärbung) selektioniert. Als Kontrolle diente der Vektor pMC1403 ohne Insert, welcher keine blauen

Kolonien ergab. Von positiven (blauen) Klonen wurde Plasmid DNA präpariert und die Anwesenheit des Promotorfragments durch Spaltung mit *NotI* und Hybridisierung mit radioaktiv markiertem Fragment E3 bestätigt. Der Klon pTM-GAL wurde zur Konjugation nach *M. clara* an Dr. Marquardt (Höchst AG, Frankfurt) übersandt.

Bei Abschluß dieser Arbeit waren die Konjugationsexperimente noch nicht abgeschlossen, so daß eine Aussage über die Effizienz der β -Galaktosidase-Expression in *M. clara* noch nicht möglich war.

4.6 Bestimmung der DNA-Sequenz des hochtranskribierten Bereichs (Fragment E3)

Um nähere Informationen über den hochtranskribierten Bereich der Plasmide (Fragment E3 von pBE-2 bzw. E9 von pBE-2) zu erhalten, war es erforderlich, das gesamte Fragment E3 von etwa 2100 bp Länge zu sequenzieren.

Hierbei wurde das Dideoxy-Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977) angewandt. Da GC-reiche Sequenzen und ausgeprägte Sekundärstrukturen im einzelsträngigen M13-Phagen häufig nicht stabil sind, wurde die Technik des doppelsträngigen Plasmidsequenzierens angewandt (Wallace, 1981; Chen & Seeburg, 1985; Heinrich, 1986), die ein direktes Sequenzieren doppelsträngiger Plasmid DNA und die Verwendung von Schnellaufschluß DNA erlaubt.

Das Fragment E3 wurde hierzu derart in pUC8 und pUC12-Vektoren subkloniert, daß eine Vielzahl von überlappenden Subklonen entstand, welche getrennt sequenziert werden konnten.

4.6.1 Subklonierung von Fragment E3

Plasmid DNA des Klons pTME3 wurde mit *EcoRI* gespalten und das hierbei entstandene Fragment E3 nach Gelelektrophorese durch Elektroelution isoliert. Zur Subklonierung wurde dieses sodann jeweils mit den Enzymen *HaeIII*, *RsaI*, *Sau3A*, *TaqI*, *MspI*, *AluI* und *BaII* gespalten. Die entstandenen

Fragmente wurden auf einem 1,5% Agarose-Gel aufgetrennt und mittels DEAE Membranfiltertechnik isoliert.

Die durch Spaltung mit *Hae*III (GG/CC), *Bal*I (TGG/CCA) und *Alu*I (AG/CT) erzeugten Fragmente weisen glatte Enden auf und wurden in einen mit *Sma*I (CCC/GGG) linearisierten und mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierten pUC8 oder pUC12 Vektor ligiert. Die Spaltung mit dem Enzym *Hae*III erwies sich jedoch wegen des hohen GC-Gehalts des Fragments und der daraus resultierenden großen Anzahl an sehr kleinen Spaltprodukten als wenig geeignet. Als ebenso ungeeignet erwies sich auch das Enzym *Rsa*I (GT/AC), für welches nur eine einzige Schnittstelle auf dem Fragment vorhanden ist. Die Spaltungen mit den übrigen, oben aufgeführten Enzymen lieferten hingegen Fragmente, welche zur überlappenden Sequenzierung geeignet waren.

Die durch *Sau*3A-Spaltung erhaltenen Fragmente wurden in einen mit *Bam*HI linearisierten und dadurch zur *Sau*3A-Schnittstelle kompatible Enden aufweisenden pUC12-Vektor kloniert, welcher ebenfalls dephosphoryliert war. Ebenso wurden die *Msp*I- und *Taq*I-Fragmente in die zu beiden Enzymen kompatible *Acc*I-Schnittstelle des pUC12-Vektors kloniert. Neben diesen Fragmenten wurden zusätzlich noch einige partielle Spaltprodukte (z.B. pTM10; pTM16) kloniert. In allen Fällen wurden zur Transformation kompetente Bakterien des Stammes *E. coli* JM83 verwendet, wobei rekombinante Klone aufgrund ihrer Defizienz an funktionsfähiger β -Galaktosidase (weiß/blau-Selektion) erkannt werden konnten.

Bei der Sequenzierung nach der unter 4.6.2 beschriebenen Strategie konnte der Bereich zwischen Position 1570 und 1670 mit den vorhandenen Klonen nicht erfaßt werden. Die diesen Abschnitt abdeckenden Klone pTM4 und pTM9 (Abb. 4.6.-1) waren zur vollständigen Sequenzierung zu lang. Da die *Not*I-Schnittstelle zwischen den *Not*I-Fragmenten N2a und N2b (vgl. Abb. 4.2.-1) noch auf dem sequenzierten Teil vorhanden war, bot sich die Isolierung und Klonierung von Fragment N2b an, um damit die "Lücke" zu schließen. Hierzu wurde das Plasmid pTME3 mit *Not*I gespalten (pBR322 enthält keine *Not*I-Schnittstelle) und die größte hierbei entstehende Bande (pBR322 + Randfragmente N2b und N3) durch Elektroelution isoliert und anschließend mit *Eco*RI nachgespalten. Von den hierbei entstehenden drei Fragmenten (pBR322, N2b und N3) wurde nach elektrophoretischer Auftrennung die zweitgrößte Bande (N2b, ca. 510 bp) isoliert. Da auf den bisher erhältlichen pUC-Vektoren keine mit *Not*I kompatible Schnittstelle vorhanden ist, wurde

das Fragment nach Auffüllen der Enden mit Klenow-Polymerase in einen mit *Sma*I linearisierten pUC12-Vektor kloniert. Eine Analyse der erhaltenen Klone (pTMN-Klone) durch Spaltung von Schnellaufschluß-DNA mit *Hind*III und *Eco*RI ergab jedoch, daß keiner der Klone ein Insert der korrekten Länge besaß, sondern stets Deletionen aufgetreten waren. Durch Sequenzierung dieser Klone konnte jedoch mittels pTMN40 und pTMN27 die Lücke geschlossen werden. Das gehäufte Auftreten von Deletionen bei Klonierung dieses Sequenzabschnitts kann durch die unter 4.6.3 näher beschriebenen Sekundärstrukturen der DNA in diesem Bereich erklärt werden (mögliches 3'-Ende der mRNA bzw. Terminationsbereich). Möglicherweise liegt hier aufgrund der eng benachbarten, umgekehrten Repetitionen eine schwer klonierbare DNA-Struktur vor.

Die zur Sequenzierung verwendeten Subklone sind in Tab. 4.6.1 zusammengestellt und in Abb. 4.6.-1 bezüglich ihrer Positionen auf dem Fragment E3 dargestellt.

4.6.2 Sequenzierung des Fragments E3

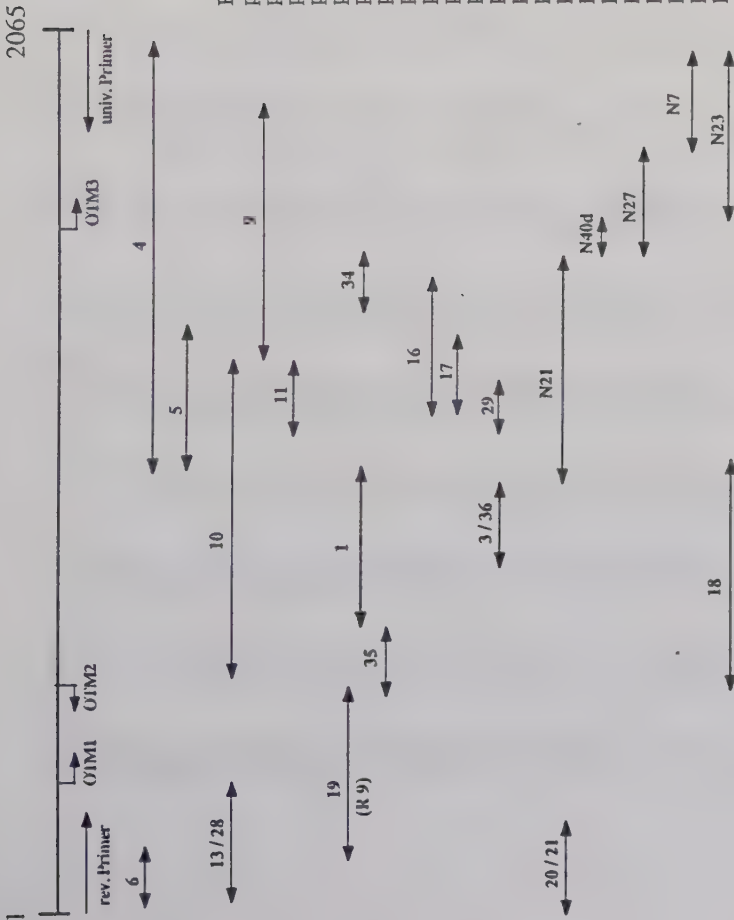
Sämtliche in Abb. 4.6.-1 aufgeführten Subklone wurden mit der Methode des doppelsträngigen Plasmidsequenzierens jeweils von beiden Seiten sequenziert, so daß die Sequenz von Strang und Gegenstrang bestimmt werden konnte. Bei pUC12 und pUC8 Vektoren erfolgt die Sequenzierung mit "revers"-Primer von der *Eco*RI-Stelle, mit "universal"-Primer von der *Hind*III Stelle aus.

Zur Absicherung der Sequenz wurden zusätzlich drei Oligonukleotide als Primer verwendet, welche von Dr. Mertz (Genzentrum München) synthetisiert und zur Verfügung gestellt wurden.

OTM1: 5'-GGAAGGAGTCTGACAATGGC-3'	(Pos. 292-310)
OTM2: 5'-GCTGGCCAGTTGATCGG-3'	(Pos. 558-542)
OTM3: 5'-CGCTCGCCGGCCTCTAC-3'	(Pos. 1597-1613)

Die Positionen der Oligonukleotide sind in Abb. 4.4.-1 eingezeichnet.

Während mit Hilfe der Oligonukleotide OTM1 und OTM2 der nur durch den Klon R9 (pTM19) erfaßte Bereich sequenziert werden konnte, diente das



Klon	Enzym	Position
pTM4	TaqI	1070 - 2019
pTM6	TaqI	28 - 170
pTM5	TaqI	1070 - 1320
pTM13	Sau3A	35 - 320
pTM10	Sau3A	544 - 1322
pTM11	Sau3A	1148 - 1322
pTM9	Sau3A	1322 - 1912
pTM18	BalI	551 - 1091
pTM19 (R9)	BalI	142 - 551
pTM34	MspI	1444 - 1571
pTM35	MspI	522 - 698
pTM1	MspI	700 - 1055
pTM36	HaeIII	826 - 1000
pTM29	HaeIII	1172 - 1259
pTM17	AluI	1176 - 1351
pTM16	AluI	1176 - 1504
pTM20	NotI	1 - 196
pTM21	NotI	1 - 196
pTMN21	NotI	1035 - 1543
pTMN27	NotI	1543 - 1818
pTMN7	NotI	1821 - 2065
pTMN23	NotI	1665 - 2065

Abb. 4.6. -1:

Übersicht über die zur Sequenzierung von Fragment E3 verwendeten Subklone. Die Zahlen entsprechen den in Tab. 4.6. -1 aufgelisteten pTM-Klonen.

Tab. 4.6. -1:

Zur Sequenzierung verwendete Subklone von Fragment E3 mit Positionsangaben bzgl. der Gesamtssequenz (vgl. Abb. 4.6. -2);

DNA-Sequenz des Fragments E3

GAATTCGAAGTGCCAGCACGCATGAAATCGACCTGATCCTGGCCAACTTG 50
 CCCATTTTTCCCGGCCTGGAGCCATTCAAGGCTCGGGCCGACGCGCCCGA 100
 TTCGTCTATCGGGGGCTTTTCCAGAGGGACGGCCGCCGAGGTGGCCACTG 150
 ACCCGCTTCCACCACCAGCTCGAAGCCGGCACGCCGAAGACAGGCGCGGC 200
 CGCCGCGGACATCCGGCCGGCGCTTCGCCCTGTTGCGTTTGTGTTGTTA 250
 PL
 -35
 CTGTAATAAATACAACATACAACAACAAACAACACAACCAACCGGAAGGAGT 300
 SD
 -10
 CTGACATGGCAAGCGAAGCGATCATCACGGAACAATTGATCTGTAAAGCC 350
 MetAlaSerGluAlaIleIleThrGluGlnLeuIleCysLysAla
 GCCGAACAACCTGGCGGCCGAGGGGATGCGCCCGACGAACGAGACGGTGCG 400
 AlaGluGlnLeuAlaAlaGluGlyMetArgProThrAsnGluThrValAr
 CGAACTGCTGGCGAAGTGGACGAGCACGAAGGGCGGCACTACGCCACCAT 450
 gGluLeuLeuAlaLysTrpThrSerThrLysGlyGlyThrThrProProS
 CGGCCCCGGTCTGCGCGCCTGGAAGGCACGCCGAAGGCTGCCGAGTCCGGC 500
 erAlaArgSerAlaArgLeuGluGlyThrProGlnGlyCysArgValGly
 CGAGCCGGTCTGCGAAGCCGCGCCGGCAAGCTGCCGAACGTACCGATCAAC 550
 ArgAlaGlyArgGluAlaAlaProAlaSerCysArgThrAspArgSerTh
 TGGCCAGCCTTCAGGCCGACGTGGCTGCACAAACCGAGCGGGCGGCGGCG 600
 rGlyGlnProSerGlyArgArgGlyCysThrAsnArgAlaGlyGlyGlyG

GGGGAGGCGCGGGCGGCCGAGCTGGAGAAGCGGGCCAACGAGGTGCATGA
lyGlyGlyAlaGlyGlyArgAlaGlyGluAlaGlyGlnArgGlyAlaEnd 650

CGACCTGAAGGCTGAACGGGCGCGACGGATGAAGCGGAGGCCGACGCCG
ArgProGluGlyEndThrGlyAlaThrAspGluAlaGluAlaAlaArgAr 700

GACGGTGGAAGCCGAGCTTTCCACCCAGCGCGCCGACGTGGCCCGACTCT
gThrValGluAlaGluLeuSerThrGlnArgAlaAspValAlaArgLeuS 750

CCCAGCAAGCGGCAGACTTGGAGCGCGAGTGGCCCAAGTTCGCGGTGAAC
erGlnGlnAlaAlaAspLeuGluArgGluTrpProLysPheAlaValAsn 800

TTGCGCGAGTGCAGGAGCAAGGAGCGGCCGAGCTGGCGGCGGGGGGAAA
LeuArgGluCysArgSerLysGluArgProSerTrpArgArgArgGlyLy 850

GAGCACGCCGAAGGGGTGGCTGCTCAACGTGCCCAGCATGATGCCGAGGT
sSerThrProLysGlyTrpLeuLeuAsnValProSerMetMetProArgT 900

GGGGCGACTGAAAGATGCTCACCAGCAGGCATTGCACGACCAGAAGCAGC
rpGlyAspEndLysMetLeuThrSerArgHisCysThrThrArgSerSer 950

GCAGCGTGGAGGTCATCGGCAAGCTGGAGGCTTCCAAGCAGCGCATGGAG
AlaAlaTrpArgSerSerAlaSerTrpArgLeuProSerSerAlaTrpAr 1000

GCCGAGCTGGACGAGGCGCGCAAAGAGGCCGCGATGCGGCCGCCCAACTT
gProSerTrpThrArgArgAlaLysArgProArgCysGlyArgProThrT 1050

GGCCGGGTGACAGGGGAACCTCGACGCGCTGCGCAGTCAAGTGGCCAGTCA
rpProGlyAspArgGlyThrArgArgAlaAlaGlnSerSerGlyGlnSer 1100

AGAGGCGACCATCCGGGGTTTCCACGCAAAAAAGGCTGACAAGACGTGAT
ArgGlyAspHisProGlyPheHisArgLysLysGlyEndGlnAspValIl 1150

CGGCTCCGCGTGGCTGCATCTGGCCAGCTTCGCGGTTCATGCTGGTGGCGA
eGlySerAlaTrpLeuHisLeuAlaSerPheAlaValMetLeuValAlaI 1200

1250
TCCGCGCCGTCCGGCGCTGGACGTGGCTGTACGCCCTGTCCGTGTGCCC
leArgAlaValArgArgTrpThrTrpLeuTyrAlaLeuSerValLeuPro

1300
GGCAGCTGGCCCCATGAGGCTATGCACTGGCTGGCCGGCTGGTTGTTTGG
GlyThrLeuAlaHisGluAlaMetHisTrpLeuAlaGlyTrpLeuPheGl

1350
TGCGCGCCCGGTTTCCCTGTTCGATCCTGCCGCGCCGGATGCCTGACGGGG
yAlaArgProValSerLeuSerIleLeuProArgArgMetProAspGlyG

1400
AGCTGCTGCTGGGGCGCGTGTGTTTCATGCGCCTGCGCTGGTGGAATGCG
luLeuLeuLeuGlyArgValLeuPheMetArgLeuArgTrpTrpAsnAla

1450
GTTCCCGTGGCCCTCGCGCCCTTCTTCTCATTCCGTTGAGCGCCGGCCT
ValProValAlaLeuAlaProPheLeuLeuIleProLeuSerAlaGlyLe

1500
GCTGTGGCATTCCGCTGGCTGGCTTGCTCTCGCATGGCCAGCCTTGCC
uLeuTrpHisSerAlaGlyTrpLeuAlaLeuAlaTrpProSerLeuGlyL

1550
TGAAGCTCCTGGCCGTGCAATGCCTGCTGGCGACGTGGCCGAGCGGCCGC
euLysLeuLeuAlaValGlnCysLeuLeuAlaThrTrpProSerGlyArg

1600
GATTGGCGGCACGCCTTGGCCGGCGCAGCCGTGGCCGGGGCGCTGACGCT
AspTrpArgHisAlaLeuAlaGlyAlaAlaValAlaGlyAlaLeuThrLe

1650
CGCCGGCCTCTACCTCTACAACCGTTTGGCTTCGCCCTGCGGTGACTTTC
uAlaGlyLeuTyrLeuTyrAsnArgLeuAlaSerProCysGlyAspPheA

1700
GCGCGCGAAAGCCTGCGCCGGCTGATGTTGTGCTTTTCATAATGAAAGCAA
rgAlaArgLysProAlaProAlaAspValValLeuSerEndEnd

PLa^x PLb^x-35 -10 -10 1750
-35
CTTTTTTGCGCACAACTATTGACGGTCAATAGTTTGACGGGTAGAATATGG

1800
GCATTGCTTCAGTGATGAGGCAATGCCTCGGTAGGGGTGAAGGTGAGCAG

ACCAGACCCCAGCCGCTTAGACCATCTTCAACCCTTCCGCATAAGGAAAA SD 1850

CGACCATGCAAACCGCCCTGGCCAAACACCACCGCCCAAGCCACGGATTAC 1900
MetGlnThrAlaLeuAlaAsnThrThrAlaGlnAlaThrAspTyr

CCGCAATGGGTGATCGTTGAGAACGCCGGCACCAGATGCCGAAGACGTGTG 1950
ProGlnTrpValIleValGluAsnAlaGlyThrAspAlaGluAspValTr

GAGTGACCACCACACTTTCAAGGCGGCGCTGAAGGAGCTGGAGAGCTGCG 2000
pSerAspHisHisThrPheLysAlaAlaLeuLysGluLeuGluSerCysG

GCGGCACGGATAACGGCTTCGACCTGATGAAGCGCCTTCCCGATGGCACC 2050
lyGlyThrAspAsnGlyPheAspLeuMetLysArgLeuProAspGlyThr

CTGACCACGGAATTC
LeuThrThrGluPhe

Abb. 4.6. -2a:

DNA-Sequenz des Fragments E3 (pBE-3) mit möglichen Leserahmen des "oberen" Strangs;

PRa/b
-35 -35 266
CGCTTGCCATGTCTAGACTCCTTCCGGTTGGTTGTGTGTGTTGTTGTTGTTA

-10 -10 SD 216
TGTTGTATTTTACAGTAAACAACAACAAACGCAACAGGCCAAGCGCCGGC

CGGATGTCGGCGCGCGCCGCGCTGTCTTCGGCGTGCCGGCTTCGAGCTG 166
MetSerAlaAlaAlaAlaProValPheGlyValProAlaSerSerTr

GTGGTGGAAGCGGGTCAGTGGCCACCTCGGCGGCCGTCCCCTCGGAAAAG 116
pTrpTrpLysArgValSerGlyHisLeuGlyGlyArgProSerGlyLysA

CCCCGATAGACGAATCGGGCGCGTCGGCCCGAGCCTTGAATGGCTCCAG 66
laProAspArgArgIleGlyArgValGlyProSerLeuGluTrpLeuGln

GCCGGGAAAAATGGGCAAGTTGGCCAGGATCAGGTCGATTTCATGCGTGC 16
AlaGlyLysAsnGlyGlnValGlyGlnAspGlnValAspPheMetArgAl

TGGCACTTCGAATTC
aGlyThrSerAsn

Abb. 4.6. -2b:

Abschnitt der DNA-Sequenz des "unteren" Strangs mit Leserahmen ausgehend vom Promotor pR;

Oligonukleotid OTM3 als Primer zur Sequenzierung des nur durch den Klon pTMN27 repräsentierten Sequenzabschnitts.

Sämtliche Sequenzdaten wurden mit Hilfe des "Micro-Genie"-Sequenzprogramms (Beckman, IBM) auf Homologien zur Vektor-DNA (pUC8 bzw. pUC12) überprüft. Mit der sogenannten "merge"-Funktion dieses Programms wurde aus den Sequenzen der einzelnen, überlappenden Klone die Gesamtsequenz zusammengesetzt. Insgesamt wurden etwa 10 000 Basen sequenziert, so daß jede Base des Fragments E3 statistisch etwa 5 mal sequenziert wurde. Abweichend von der Statistik kam es zu teilweise hoher Redundanz bestimmter Sequenzabschnitte, jedoch wurde jede Base mindestens zweimal sequenziert. Die Gesamtlänge des Fragments E3 ergab sich zu 2065 bp. Der GC-Gehalt beträgt 64,7 %, wobei häufig GC-Cluster auftreten. Abb. 4.6.-2 zeigt die Gesamtsequenz von Fragment E3 mit eingezeichneten Transkriptionselementen (Promotoren pR und pL - siehe 4.2 und 4.3 - sowie Terminator und nachfolgende Promotoren pL* und pR*- siehe 4.6.4).

Die Abfrage der DNA-Datenbank ergab keine signifikante Homologie zu bekannten DNA-Sequenzen.

4.6.3 Struktur des Terminators und der nachfolgenden Promotoren

Terminator

Von Position 1646 bis Position 1733 treten drei hintereinanderliegende, umgekehrte Repetitionen auf, von denen eine die für bakterielle Gene charakteristische RNA-Terminationsstruktur besitzt. Abb. 4.6-3a zeigt eine mögliche Sekundärstruktur (Um gleichzeitig den nachfolgenden Promotor pL* darstellen zu können, wurde die Sekundärstruktur in Form von DNA und nicht von RNA gezeichnet).

Die umgekehrte Repetition bei Position 1681 (IR2) besitzt eine für ρ unabhängige Terminatoren charakteristische "stem-loop"-Struktur mit einem GC-reichen und einem AT reichen Abschnitt im Stamm und einer auf den Stamm folgenden Poly T bzw. Poly U-Sequenz (Brendel & Trifonov, 1984).

Falls das Stopcodon UGA (opal) von *M. clara* nicht als solches erkannt wird (siehe 4.6.4), tritt das erste Stopcodon (UAA) im "Loop" der Terminatorstruktur auf. Dies ist bei bakteriellen Transkriptionseinheiten eher ungewöhnlich, doch findet sich bei dem von Yanofsky untersuchten

Attenuationsmodell des Tryptophan-Operons ein ähnlicher Fall (Landick & Yanofsky, 1987).

Möglicherweise hat auch die 18 Basen stromaufwärts liegende umgekehrte Repetition (IR1) für die Termination Bedeutung. IR1 besitzt einen nach Tinoco et al. (1973) berechneten δG -Wert von - 5,0 kcal/mol. Bei IR2 beträgt dieser Wert - 6.2 kcal/mol. Zwei weitere umgekehrte Repetitionen mit jeweils zwei Fehlpaarungen finden sich bei Position 1562-1592 ($\delta G=-22$ kcal/mol) und bei Position 1598-1608 ($\delta G=-19,2$ kcal/mol). Möglicherweise tragen diese Strukturen zur Stabilisierung der mRNA bei (Stern & Gruissem, 1987; Newbury et al., 1987).

Das Auftreten einer Terminatorstruktur an den oben genannten Positionen stimmt mit den Ergebnissen der RNA-Kartierung von Fragment E3 (siehe 4.2.1) weitgehend überein. Daß das Randfragment N2b, welches den Bereich von Position 1543 (*NorI*-Schnittstelle) bis Position 2065 (*EcoRI*-Schnittstelle) überdeckt und somit noch etwa 150 bp aus dem stark transkribierten Bereich enthält, nur äußerst schwach gegen radioaktiv markierte RNA hybridisierte, resultiert offensichtlich aus den oben genannten Sekundärstrukturen der RNA in diesem Abschnitt, welche eine effiziente RNA-DNA-Hybridisierung erschweren und somit das Hybridisierungssignal stark abschwächen.

Promotoren pL und pR**

12 Basen nach den Poly T-Resten der postulierten Terminationsstruktur ist wiederum eine Sequenz mit ausgeprägter Homologie zur Consensus-Sequenz bakterieller Promotoren zu finden (beginnend bei Position 1713). Wie bei den unter 4.3 beschriebenen Promotoren pL und pR weist auch dieser, mit pL* abgekürzte Promotor je zwei hintereinanderliegende "-35" und "-10" Regionen mit den bei *E. coli* Promotoren hochkonservierten Nucleotiden auf (Tab.4.6.-1). Die "-35"-Region liegt hierbei in einer umgekehrten Repetition von je 10 Basen Länge. Eine mögliche Sekundärstruktur ist in Abb.4.6.-3 dargestellt. Der Abstand zwischen beiden Regionen beträgt 17 bzw. 18 bp. Wie zu erwarten, folgt 7 bzw. 8 Basen nach der "-10" Region ein Adenosin-Nukleotid, welches als potentieller Transkriptionsstart postuliert werden kann. 107 Basen stromabwärts folgt ein ATG-Trinukleotid, welchem in einem Abstand von 8 Basen eine mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz (AGGAA) vorausgeht.

Wie aus Abb. 4.6.-3a zu ersehen ist, findet sich auch auf dem komplementären Strang eine mögliche Promotorstruktur (pR*). Auch hier sind alle in der *E. coli* Consensus-Sequenz hochkonservierten Nukleotide vorhanden. 6 Basen nach der Pribnow-Schaller-Box findet sich ein Adenosin-Nukleotid als möglicher Startpunkt der mRNA. Der Abstand der -10- und -35 Boxen liegt mit 20 Basen jedoch 1 Base über der für *E. coli* Promotoren angegebenen Grenze (vgl. 5.2). Auch hier liegt die -35 Region in einer umgekehrten Repetition (IR4). Das erste dem Promotor stromabwärts folgende ATG-Codon liegt bei Position 1684, jedoch findet sich hier keine Shine-Dalgarno-Sequenz.

Promotor	"-35"	"-10"	SD
pLb*	TTGACG	TAGAAT	AGGAA
pLa*	TTGCGC	TAGTTT	— " —
pR*	TTGCCT	TATTCT	—
Consensus	TTGACA	TATAAT	

Tab. 4.6. -1:

Übersicht über die Promotorelemente pL* und pR*

Buchstaben in Fettdruck stehen für hochkonservierte Nukleotide in der *E. coli* Consensus-Sequenz.

Wie die Promotoren pL und pR (siehe 4.3) sind auch diese Promotoren (pL* und pR*) überlappend und divergierend. Offensichtlich handelt es sich um eine hochregulierte Transkriptionseinheit, bei der unter den hier gegebenen Bedingungen nur der Promotor pL aktiv ist.

Abb. 4.6.-4 zeigt schematisch die aus den Sequenzdaten abgeleitete Anordnung der Promotoren auf Fragment E3 (pBE-3).

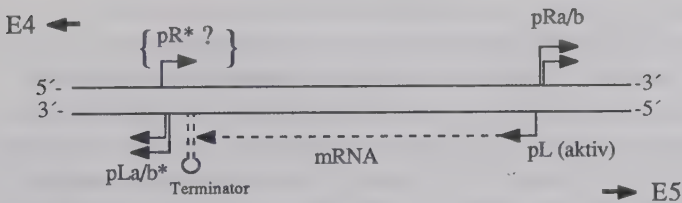


Abb. 4.6. -4:

Schematische Darstellung der Anordnung von Promotoren auf Fragment E3

4.6.4 Offene Leserahmen auf Fragment E3

Untersucht man die Sequenz E3 auf offene Leserahmen (ORF), so finden sich auf dem oberen Strang (Abb. 4.6.-2), ausgehend vom ersten auf den Promotor pL folgenden ATG-Codon (Position 306), zwei längere und zwei kürzere offene Leserahmen. Hierbei fällt auf, daß zwischen diesem Startcodon und der Terminatorstruktur (mit TAA-Stopcodon) ausschließlich UGA (opal) - Stopcodons auftreten:

ORF's, ausgehend vom Promotor pL:

ORF1: ATG (306) — TGA (663);

ORF2: ATG (679) — TGA (796);

ORF3: ATG (888) — TGA (1137);

ORF4: ATG (1188) — TAA-TGA (1689); { Terminatorstruktur }

Möglicherweise handelt es sich bei *M. clara* jedoch um einen UGA (opal) Suppressor-Stamm. Derartige Stämme, welche aufgrund veränderter tRNA-Moleküle bei der Proteinbiosynthese Stopcodons nicht erkennen und an dieser Stelle eine Aminosäure einbauen (z.B. Tyrosin bei supF), sind bei *E. coli* seit langem bekannt (Garen, 1968; B. Seed, 1983). Unter der Annahme, daß das Codon UGA in *M. clara* nicht als Stop gelesen wird, ergäbe sich ein durchgehender Leserahmen vom aktiven Promotor pL bis zur Terminationsstruktur, welcher für ein Protein von 461 Aminosäuren kodieren würde:

ORF*: ATG (306) — TAA-TGA (1689)

Offener Leserahmen ausgehend vom Promotor pR:

Beginnend mit dem ersten auf den Promotor pR folgenden ATG-Codon findet sich ein bis zur *EcoRI* Schnittstelle reichender offener Leserahmen:

ORF 1': ATG (212) — *EcoRI* (1), { Richtung Fragment E5 (pBE-3) };

Offener Leserahmen, ausgehend vom Promotor pL*:

Auch auf den Promotor pL* folgt 107 Basen nach dem potentiellen Transkriptionsstart ein ATG-Codon. Daran schließt sich wiederum ein offener Leserahmen an:

ORF''1: ATG (1856) — *EcoRI* (2065), { Richtung Fragment E4 (pBE-3) };

4.7 Charakterisierung des plasmidhomologen Bereichs im Genom des Stammes *M. clara* BE-1

Durch Southern-Blot Analysen konnte mehrfach gezeigt werden, daß der plasmidfreie Stamm *M. clara* BE-1 in seinem Genom zum Plasmid pBE-3 homologe Bereiche enthält (Marquardt, 1983; Metzler, 1984). Eine einfache Zuordnung der im Southern-Blot auftretenden Banden zum Restriktionsmuster von pBE-3 war jedoch nicht möglich (Abb. 4.7.-1).

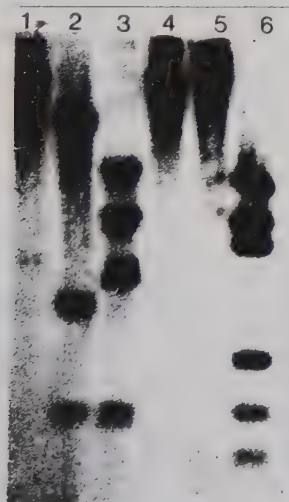


Abb.4.7.-1:
Southern-Blot Analyse
chromosomaler DNA
aus *M. clara* BE-1 mit
 ^{32}P -pBE-3;

Spur 1: *Hind*III
2: *Hinc*II
3: *Eco*RI
4: *Sal*I
5: ungespalten
6: pRMt25b/*Eco*RI

Da die Untersuchung großer, plasmidhomologer Abschnitte im Genom eines plasmidfreien Stammes sowohl zur Entdeckung neuer Transposons führen als auch zur Aufklärung von Umlagerungs- und Rekombinationsprozessen beitragen könnte, schien es von Interesse, die in meiner Diplomarbeit isolierten Cosmidklone pTM5/87 und pTM1/56 näher zu charakterisieren. Da die Etablierung eines Expressionssystems in *M. clara* nur im plasmidfreien Stamm BE-1 möglich ist, erschien eine Untersuchung der im Genom von BE-1 integrierten Plasmidanteile auch im Hinblick auf eine mögliche Wechselwirkung (Rekombination etc.) dieser Sequenzen mit dem Expressionsvektor notwendig.

4.7.1 Analyse der Cosmidklone pTM5/87 und pTM1/56

Zunächst wurden die Klone pTM5/87 und pTM1/56, die aus einer im Vektor pHCT9 angelegten Cosmidgenbank isoliert worden waren, miteinander verglichen und in ihrer Homologie zu freiem Plasmid untersucht. Da das Plasmid pBE-3 (16 kb) eine colineare Deletionsmutante des Plasmids pBE-2 (46 kb) darstellt, wurden alle weiteren Untersuchungen mit dem Stammaplasmid pBE-2 (46 kb) durchgeführt. Plasmid-DNA von pBE-2 und Plasmid-DNA der beiden Cosmidklone pTM5/87 und pTM1/56 wurde jeweils mit den Enzymen *EcoRI*, *AvaI* und *HincII* gespalten, die jeweiligen Spaltungen nebeneinander auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt (Abb. 4.7.-2a) und nach Transfer auf NC-Filter mit radioaktiv markiertem Plasmid pBE-2 hybridisiert (Abb. 4.7.-2b).

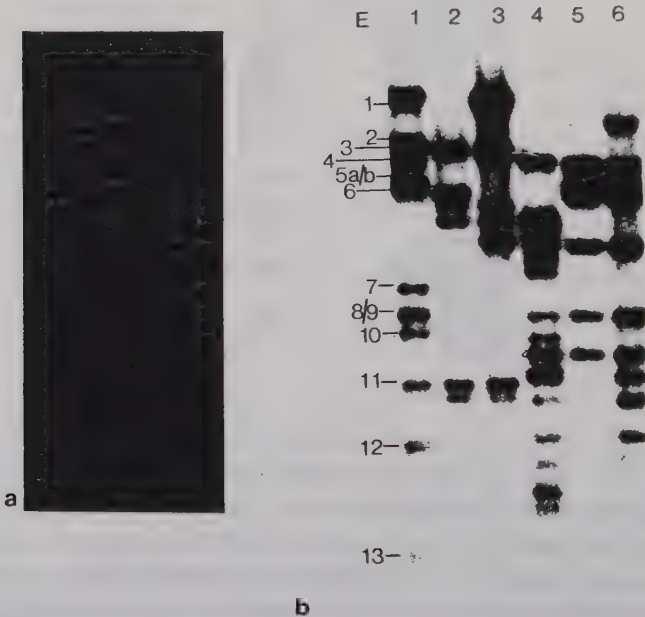
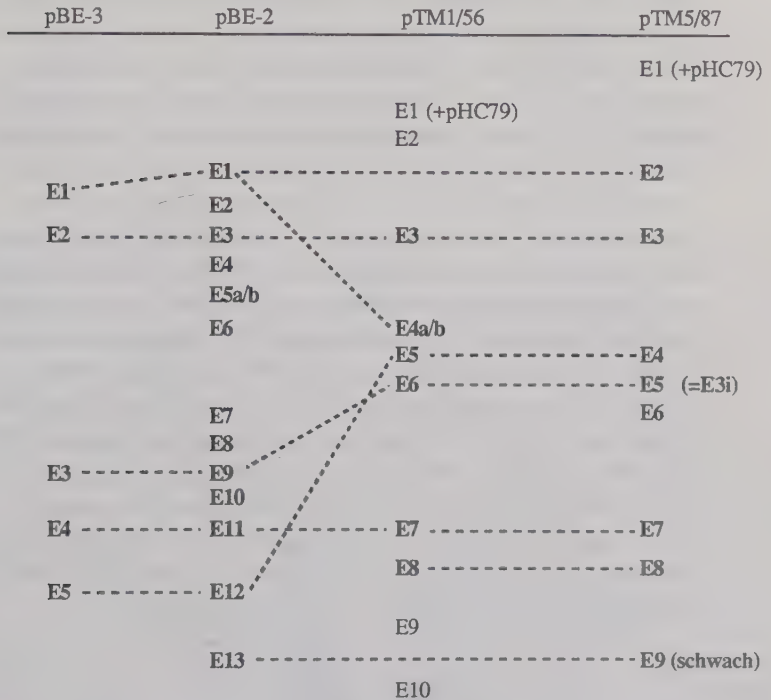


Abb 4.7. -2:

Hybridisierung von pBE-2, pTM1/56 und pTM5/87 Restriktionsfragmenten mit ³²P-pBE-2 (b) und entsprechendes Agarosegel (a);

Spur 1: pBE-2/*EcoRI* 4: pBE-2/*AvaI*
 2: pTM1/56/*EcoRI* 5: pTM1/56/*AvaI*
 3: pTM5/87/*EcoRI* 6: pTM5/87/*AvaI*

Die Spaltung der Cosmidklone mit *Eco*RI ergibt 9 (pTM5/87) bzw. 10 (pTM1/56) auf dem Agarosegel nachweisbare Fragmente, welche in Tab. 4.7.-1 nach abnehmender Größe (E1 bis E10) dargestellt sind.



Tab. 4.7.-1:

Übersicht über die bei *Eco*RI-Spaltung entstehenden Fragmente der Cosmidklone pTM1/56 und pTM5/87 im Vergleich zu denjenigen von pBE-2 und pBE-3; Zueinander homologe Fragmente (Nachweis durch Hybridisierung mit Subklonen von pBE-3 oder Erscheinen bei gleichem Molekulargewicht) sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Gegen radioaktiv markiertes pBE-2 Plasmid hybridisierende Fragmente sind in Fettdruck dargestellt. (vgl. auch Abb.4.7. -2a und b, sowie Abb. 4.7. -6 und Restriktionskarte Abb. 4.7.-5).

Beide Cosmidklone sind also in weiten Bereichen miteinander identisch. Im Vergleich mit dem pBE-2 Spaltmuster traten jedoch nur die den pBE-2 Fragmenten E1, E3, E11 und E13 entsprechenden und hybridisierenden *Eco*RI-Fragmente von pTM5/87 bei gleichem Molekulargewicht auf (nämlich

E^{5/872}; E^{5/873}; E^{5/877}; und E^{5/879}). Die ebenfalls hybridisierenden *EcoRI*-Fragmente E^{5/874}; E^{5/875}; E^{5/876} und E^{5/878} von pTM5/87 korrespondieren hingegen nicht mit pBE-2 Banden entsprechender Größe. Wie aus der Autoradiographie (Abb. 4.7.-2b) der Hybridisierung mit radioaktiv markiertem Plasmid pBE-2 hervorgeht, hybridisieren bei *EcoRI*-Spaltung von pTM5/87 also alle Fragmente außer E^{5/871}, bei *EcoRI*-Spaltung von pTM1/56 alle außer E^{1/561}, E^{1/562}, E^{1/569} und E^{1/5610}. Somit enthält der Klon pTM5/87 einen weitaus größeren, zu pBE-2 homologen Bereich als der Klon pTM1/56. Die gegen pBE-2 hybridisierenden Banden sind in Tab. 4.7.-1 in Fettdruck eingezeichnet. Das Ergebnis ist in die Restriktionskarte von pBE-2 eingetragen (Abb. 4.7.-5).

Um festzustellen, ob der gesamte zu pBE-2 homologe Bereich des Genoms von BE-1 zumindest auf dem Cosmidklon pTM5/87 enthalten ist, wurde chromosomale DNA des Stammes BE-1 mit *EcoRI* und *AvaI* gespalten und im Southern-Blot gegen radioaktiv markiertes pBE-2 Plasmid hybridisiert (Abb. 4.7.-3). Bei Spaltung mit *EcoRI* tritt ein nahezu identisches Hybridisierungsmuster auf wie beim Cosmidklon pTM5/87. Lediglich die beiden Banden, welche den Fragmenten E1 und E2 entsprechen, könnten im Southern-Blot möglicherweise eine Doppelbande darstellen. Insgesamt war damit jedoch gezeigt, daß der größte Teil des plasmidhomologen Bereichs im Genom des Stammes BE-1 auf dem Cosmidklon pTM5/87 enthalten ist. Außerdem konnte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß größere Umlagerungen auf den Cosmidklonen in *E. coli* erfolgt waren.

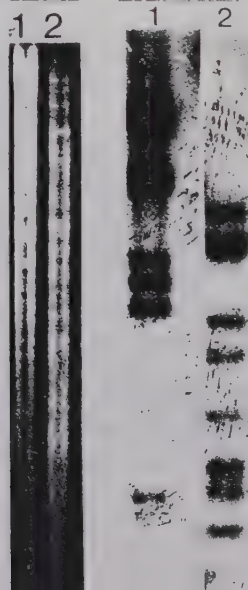


Abb. 4.7.-3
Southern-Blot Analyse
chromosomaler DNA
aus *M. clara* BE-1 mit
³²P-pBE-2

Spur 1: *EcoRI*
Spur 2: *AvaI*

links: Agarose-Gel
rechts: Southern-Blot

4.7.2 Bestimmung des homologen bzw. integrierten Anteils von pBE-2

Da im Southern Blot die gegen radioaktiv markiertes pBE-2 Plasmid hybridisierenden Banden dem Spaltmuster von pBE-2 nur teilweise zugeordnet werden konnten, war es zunächst nicht möglich, den insgesamt zu pBE-2 homologen Bereich im Genom des Stammes BE-1 zu bestimmen. Da jedoch zumindest auf dem Klon pTM5/87 der homologe Bereich zum größten Teil, wenn nicht vollständig, enthalten ist, bot sich die Möglichkeit, durch Hybridisierung geblotteter Restriktionsfragmente von pBE-2 mit radioaktiv markiertem pTM5/87 denjenigen Anteil des Plasmids pBE-2, welcher insgesamt im Genom von BE-1 enthalten ist, genauer zu bestimmen.

Hierzu wurde pBE-2 DNA mit den Enzymen *Ava*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hinc*II sowie mit *Eco*RI/*Eco*RV gespalten und auf NC-Filter übertragen. Nach Hybridisierung mit radioaktiv markiertem pTM5/87 und anschließender Autoradiographie (Abb. 4.7.-4a) wurde der Filter mit radioaktiv markiertem pBE-2 Plasmid nachhybridisiert, um eine eindeutige Zuordnung der hybridisierenden Banden treffen zu können (Abb. 4.7.-4c).

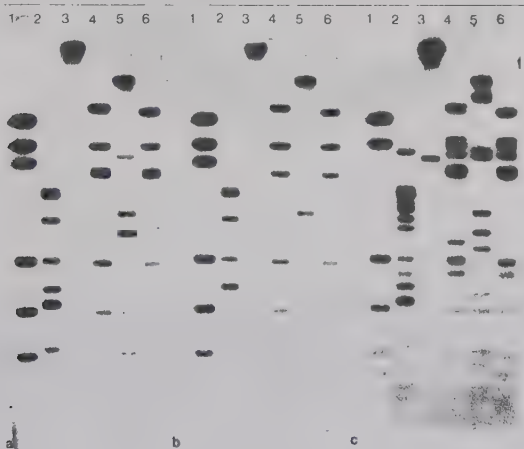


Abb. 4.7.-4:

Hybridisierung von Restriktionsfragmenten des Plasmids pBE-2 mit

a: ^{32}P -pTM5/87; b: ^{32}P -pTM1/56; c: ^{32}P -pBE-2;

Spur 1: pRM125b/*Eco*RI

2: pBE-2/*Ava*I

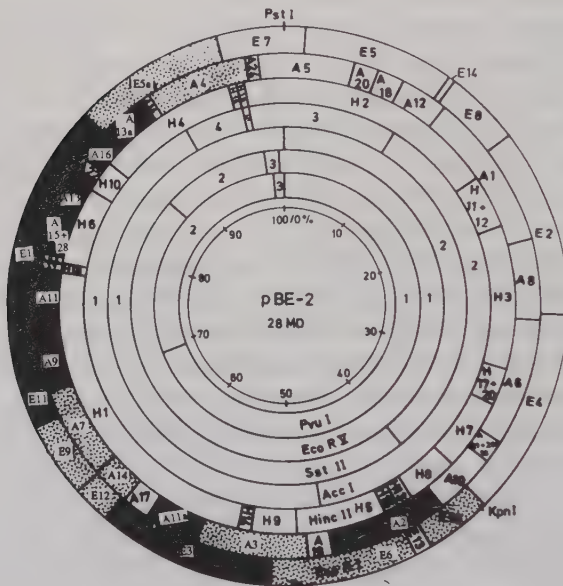
3: pBE2/*Bam*HI

4: pBE-2/*Eco*RI

5: pBE-2/*Hinc*II

6: pBE-2/*Eco*RI/*Eco*RV

Die Hybridisierung wurde nach völligem Abwaschen der Radioaktivität auch mit dem Klon pTM1/56 durchgeführt (Abb. 4.7.-4b).



intakt, da diese Fragmente im Klon pTM5/87 bei gleichem Molekulargewicht erscheinen wie die entsprechenden pBE-2 Fragmente. Die pBE-2 Fragmente E6, E12, E9 und E5a hingegen sind zwar im Genom von BE-1 enthalten, jedoch offensichtlich in veränderter Struktur, da sie einerseits hybridisieren, andererseits aber nicht bei dem der pBE-2 Fragmente entsprechendem Molekulargewicht erscheinen (Bei Fragment E6 ist die Zuordnung nicht mit letzter Sicherheit möglich).

Möglicherweise wurden also bei der Integration des Plasmids Fragmente umgelagert oder Anteile zellulärer DNA eingeschoben.

4.7.3 Teilweise Zuordnung der integrierten Fragmente

Um die zu pBE-2 homologen, jedoch bei anderem Molekulargewicht erscheinenden Fragmente der beiden Cosmidklone pTM1/56 und pTM5/87 jeweils ihrem entsprechenden Abschnitt auf pBE-2 zuordnen zu können, wurden die Cosmidklone mit *EcoRI* gespalten und nach elektrophoretischer Auftrennung wie üblich auf NC-Filter übertragen. Zur Hybridisierung wurden folgende Subklone des Plasmids pBE-3 verwendet (Marquardt, 1983):

- pRM12 (Fragmente E1 (pBE-3) + E2 (pBE-3) in pBR322)
- pRM2 (Fragment E2 (pBE-3) in pBR322)
- pRM5 (Fragment E5 (pBE-3) in pBR322)

Diese Klone wurden radioaktiv markiert und nacheinander gegen die *EcoRI* gespaltenen Cosmidklone hybridisiert (Abb. 4.7.-6). Da das Cosmid pHCT9, in dem die Cosmidgenbank angelegt war, mit pBR322 hybridisiert, konnte nebenbei jeweils das Fragment bestimmt werden, in welchem der Cosmidvektor enthalten ist. Sowohl bei pTM5/87 als auch bei pTM1/56 war dies das *EcoRI* Fragment E1. Durch die Zuordnung der zwischen pBE-2 und den Cosmidklonen homologen, aber umgelagerten Fragmente, die in Tab. 4.7.-1 durch gestrichelte Linien gekennzeichnet sind, besteht nun die Möglichkeit, die im Genom des Stammes *M. clara*--BE-1 enthaltenen und strukturell veränderten Plasmidbereiche mit den entsprechenden des freien Plasmids zu vergleichen (Kartierung, Sequenzierung) und dadurch möglicherweise die Mechanismen der Integration oder Umlagerung aufzuklären. Beispielsweise geht aus den Hybridisierungen mit obigen Subklonen hervor, daß das Fragment E12 von pBE-2 (E5 von pBE-3) dem

Fragment E5 von pTM1/56 bzw. E4 von pTM5/87 entspricht. Zur näheren Untersuchung eines ins Genom von BE-1 unter struktureller Veränderung integrierten Fragments wurde der zum hochtranskribierten Fragment E3 (pBE-3) homologe chromosomale Bereich ausgewählt. Dessen Identifizierung und Subklonierung ist im folgenden Abschnitt beschrieben. Die Zuordnung der im Genom von *M. clara* BE-1 enthaltenen *Eco*RI Fragmente zu ihren homologen Plasmid-Partnern ist in Tab. 4.7. -1 eingezeichnet.

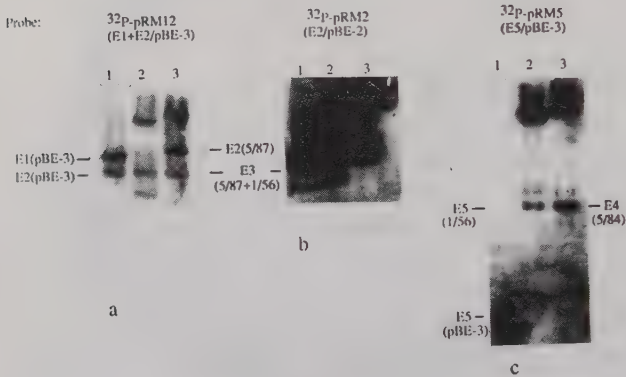
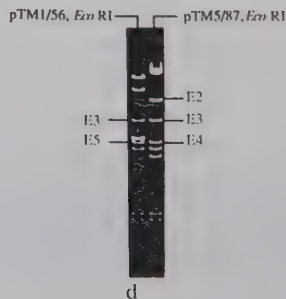


Abb.4.7.-6:

Hybridisierung mit radioaktiv markierten *Eco*RI-Subklonen von pBE-3;
a-c: Southern-Blot; d: Agarosegel;

- Spur 1: pBE-3/*Eco*RI
 2: pTM1/56/*Eco*RI
 3: pTM5/87/*Eco*RI



4.8 Charakterisierung des zum hochtranskribierten Fragment E3 (pBE-3) homologen Bereichs im Genom des Stammes BE-1

Zu den unter 4.7.2 beschriebenen, ins Genom von BE-1 integrierten, aber "umgelagerten" Fragmenten zählt auch das Fragment E3 (pBE-3). Um eine detailliertere Untersuchung der homologen, aber bezüglich des freien Plasmids strukturell veränderten Bereiche zu ermöglichen, wurde exemplarisch dasjenige Fragment aus dem Klon pTM5/87, welches mit Fragment E3 aus pBE-3 (=E9 aus pBE-2) hybridisiert, subkloniert und näher charakterisiert. Dieses Fragment wurde als E3i (i = integriert) bezeichnet.

4.8.1 Identifizierung von E3i

Um die Lage des Fragmentes E3i auf den Cosmidklonen zu identifizieren und für weitere Untersuchungen zu subklonieren, wurden die Klone pTM1/56 und pTM5/87 sowie chromosomale DNA aus dem Stamm *M. clara* BE-1 jeweils mit den Enzymen *HincII*, *AvaI* und *EcoRI* gespalten. Zum Vergleich wurde pBE-2 DNA mit *EcoRI* gespalten und auf NC-Filter übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit isoliertem und radioaktiv markiertem Fragment E3 (pBE-3). Sowohl beide Cosmidklone als auch die chromosomale DNA zeigten ein identisches Hybridisierungsmuster (Abb. 4.8.-1), wodurch nochmals eindeutig bestätigt war, daß die strukturellen Veränderungen nicht auf einem Klonierungsartefakt beruhten. Das zu E3 homologe, integrierte Fragment (E3i) konnte durch diese Hybridisierung als Fragment E6 von pTM1/56 bzw. E5 von pTM5/87 identifiziert werden (vgl. Abb. 4.8.-1 und Tab. 4.7. -1).

4.8.2 Subklonierung des Fragments E3i

Nach *EcoRI*-Spaltung des Klons pTM5/87 und gelelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente wurde das Fragment E5 (= E3i) mittels DEAE-Membranfiltertechnik isoliert und in einen mit *EcoRI* linearisierten und dephosphorylierten pUC12-Vektor kloniert (Subklon pTM33). Somit stand nun der dem hochtranskribierten Plasmidabschnitt homologe bzw. integrierte

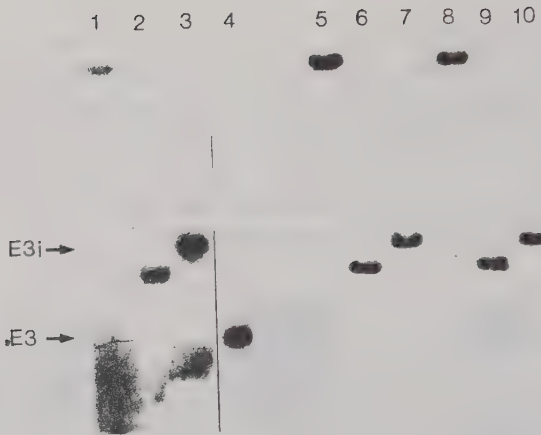


Abb. 4.8.-1:

Hybridisierung mit ^{32}P -E3 (pBE-3); Spur 1-3: chromosomale DNA aus BE-1;

Spur 1: *Hinc*II 6: pTM1/56/*Ava*I
 2: *Ava*I 7: pTM1/56/*Eco*RI
 3: *Eco*RI 8: pTM5/87/*Hinc*II
 4: pBE-2/*Eco*RI 9: pTM5/87/*Ava*I
 5: pTM1/56/*Hinc*II 10: pTM5/87/*Eco*RI

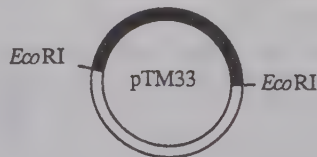
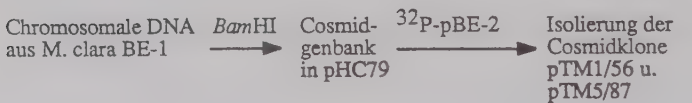


Abb. 4.8.-2: Strategie zur Klonierung von E3i (Erläuterung siehe Text).

und strukturell veränderte Bereich des Genoms von *M. clara* BE-1 zur weiteren Untersuchung zur Verfügung.

4.8.3 Charakterisierung des Fragments E3i

Homologie zu Fragment E3

Das in pUC12 subklonierte Fragment E3i wurde aus Plasmid-DNA des Klon s pTM33 durch *EcoRI* Spaltung und anschließende Elektroelution in größerer Menge isoliert. Aus zu diesem Zeitpunkt vorläufigen Sequenzdaten des Fragments E3 (pBE-3) war die Lage einer singulären *RsaI*-Schnittstelle bekannt.

Die isolierten Fragmente E3 und E3i wurden jeweils mit *RsaI* gespalten, auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und nach Übertragung auf NC-Filter mit radioaktiv markiertem Fragment E3 hybridisiert (Abb. 4.8.-3a/b).

Während bei *RsaI* Spaltung von Fragment E3 wie erwartet 2 Banden (836 bp; 1229 bp) auftraten, ergab die Spaltung von E3i mindestens 5 Banden, wobei die drittgrößte Bande mit der 836 bp großen Bande des Fragments E3 (pBE-3) übereinstimmt (Abb. 4.8.-4a). Aus der Autoradiographie der Hybridisierung geht hervor, daß diese Bande stark hybridisiert, während die größte Bande von E3i, welche bei etwas niedrigerem Molekulargewicht als das größte *RsaI* Fragment von E3 erscheint, nur sehr schwach hybridisiert. Offensichtlich ist also die *RsaI*-Schnittstelle des Fragments E3 bei Position 1229 auch auf dem Fragment E3i noch vorhanden. Aufgrund des schwachen Hybridisierungssignals der größeren Bande kann geschlossen werden, daß jenseits dieser *RsaI* Stelle auf Fragment E3i nur noch ein kleiner DNA-Bereich zum Fragment E3 des freien Plasmids homolog ist. Daraus ergibt sich, daß Fragment E3i mit Fragment E3 von Position 2065 bis 1229 (vgl. Positionen der Sequenz von E3, Abb. 4.6.-2) identisch oder äußerst homolog sein sollte und der "Bruchpunkt" unweit vor Position 1229 liegen könnte (Abb. 4.8.-4).

Da einerseits das Fragment E3i subkloniert vorliegt und andererseits die gesamte Sequenz von Fragment E3 bekannt ist, besteht nun die Möglichkeit, durch weitere Restriktionsanalysen und Hybridisierungsexperimente die Homologie zwischen E3 und E3i im Detail zu analysieren und die DNA-Sequenz des Bruchpunkts zu bestimmen. Dies wurde in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

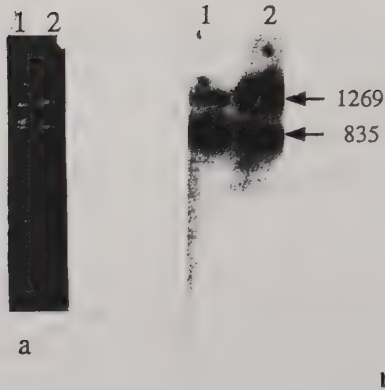


Abb. 4.8.-3:

a: Agarosegel; b: Southern-Blot ; Hybridisierung mit ^{32}P -E3;
 Spur 1: E3i/*Rsa*I
 Spur 2: E3/*Rsa*I

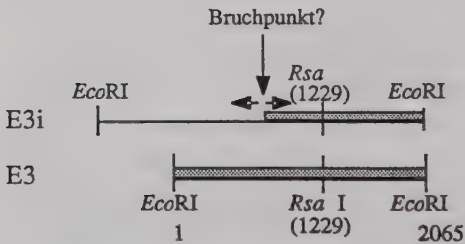


Abb. 4.8.-4:

Schematische Darstellung der Homologie von E3 und E3i;
 (Erläuterung siehe Text)

Randsequenz

Da das Fragment E3 (pBE-3) umgelagert im Genom des plasmidfreien Stamms vorliegt und möglicherweise zelluläre DNA-Sequenzen in den plasmidhomologen Bereich eingeschoben sind, wurde der Klon pTM33 mit pUC-universal Primer vom Rand ansequenziert, um über die DNA-Datenbank

zu ermitteln, ob der nicht plasmidhomologe Anteil von Fragment E3i Homologien zu bekannten prokaryotischen oder eukaryotischen Genen besitzt. Die ermittelte DNA-Randsequenz wurde jedoch in dieser Arbeit nicht mehr weiter abgesichert.

Die Abfrage der Datenbank erbrachte keine größeren homologen Bereiche zu bekannten Genen.

Transkription

Da offensichtlich die Promotoren pL und pR des Fragments E3 auf dem Fragment E3i nicht enthalten sind, war es von Interesse, zu überprüfen, ob der im Genom integrierte, zu E3 homologe Bereich in *M. clara* BE-1 transkribiert wird.

Hierzu wurde aus dem Stamm *M. clara* BE-1 RNA isoliert und im Northern-Blot gegen radioaktiv markiertes Fragment E3 hybridisiert. Im Gegensatz zu RNA aus dem Stamm *M. clara* BE-3, welcher das freie Plasmid enthält, trat hierbei jedoch kein Signal auf. Offensichtlich wird der im Genom integrierte Anteil von Fragment E3 nicht transkribiert. Dies bestätigte auch frühere Experimente, bei denen das gesamte Plasmid pBE-3 nicht mit RNA aus dem Stamm *M. clara* BE-1 hybridisierte.

4.9 Untersuchung der Plasmide pBE-2 bzw. pBE-3 auf Homologien zur chromosomalen DNA aus *E. coli* HB 101

Um zu überprüfen, ob eventuell auch im Genom eines *E. coli* K12-Stammes Homologien zu den *M. clara* -Plasmiden vorhanden sind, wurde aus dem Stamm *E. coli* HB 101 chromosomale DNA isoliert und mit den Enzymen *Eco*RI, *Bam*HI und *Ava*I gespalten. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde im Southern-Blot zunächst mit radioaktiv markiertem Fragment E3 (pBE-3) und nach negativem Ergebnis mit radioaktiv markiertem pBE-2 Plasmid hybridisiert. Unter üblichen Hybridisierungsbedingungen war auch bei sehr langer Exposition keinerlei Homologie von pBE-2 zur chromosomalen DNA aus *E. coli* zu erkennen. Als Positiv-Kontrolle wurde gesplattene DNA aus *M. clara* BE-1 aufgetragen, welche die üblichen Signale ergab (Abb. 4.9.-1).

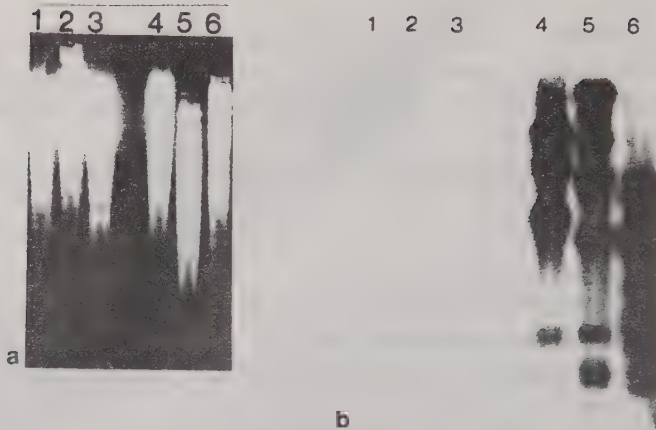


Abb. 4.9-1:

a: Agarosegel; b: Southern-Blot, Hybridisierung mit ^{32}P -E3 und ^{32}P -pBE-2

Spur 1-3: Chromosomale DNA aus *E. coli* HB101;

1: *Eco*RI; 2: *Bam*HI; 3: *Ava*I

Spur 4-6: Chromosomale DNA aus *M. clara* BE-1;

4: *Eco*RI; 5: *Hinc*II; 6: *Ava*I;

4.10 Ermittlung biologischer Funktionen von pBE-2 bzw. pBE-3 durch Homologievergleiche

Obwohl *M. clara* -Stämme und deren Plasmide seit mehr als 10 Jahren von mikrobiologischer und genetischer Seite untersucht werden (Hohenloser et al., 1978; Whittenbury et al., 1970; Marquardt et al., 1984), blieb die biologische Funktion der Plasmide bislang völlig unbekannt. Auch bei allen anderen obligat methylotrophen Stämmen wurde bis jetzt in keinem Fall die Funktion der Plasmide aufgeklärt. (Hou, 1984; Haber et al., 1983). Bei den verschiedenen *M. clara* -Stämmen konnten bislang auch keine phänotypischen Unterschiede zwischen plasmidfreien und plasmidhaltigen Stämmen beobachtet werden.

Als erster Schritt zur Aufklärung sowohl möglicher biologischer Funktionen als auch zur Bestimmung von Verwandtschaftsbeziehungen zu anderen Plasmiden, wurden etwa 30 verschiedene Plasmide auf Homologie zu pBE-2 aus *M. clara* BE-2 untersucht.

4.10.1 Homologie von pBE-2 zu Plasmiden mit breitem Wirtsbereich

Um ein möglichst breites Spektrum an Plasmidfunktionen zu erfassen, wurden vorwiegend Plasmide mit breitem Wirtsbereich verwendet (sog. "broad host range"-Plasmide). Der Großteil der hier verwendeten Plasmide wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Lanka zur Verfügung gestellt.

Jeweils etwa 300 ng DNA der in Tab. 4.10.1 aufgeführten Plasmide wurden ungespalten auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen und nach elektrophoretischer Auftrennung und Übertragung auf NC-Filter mit radioaktiv markierter DNA des Plasmids pBE-2 hybridisiert. Wie aus der Autoradiographie hervorgeht, hybridisierten unter üblichen Bedingungen folgende Plasmide: R55; R538; R387; s.-a.; R751; TP114drp1 und N3 (vgl. Tab. 4.10.2).

Da die NC-Filter unter stringenten Bedingungen gewaschen wurden (0,1x SSC; 1%SDS; 55-60 °C), enthalten diese Plasmide offensichtlich Bereiche mit hoher und signifikanter Homologie zum Plasmid pBE-2 aus *M. clara* BE-2.

Zunächst lag nur vom Plasmid R751 eine Restriktionskarte vor, welche freundlicherweise von Herrn Dr. Lanka zur Verfügung gestellt wurde. Um "funktionelle" Restriktionskarten auch von den übrigen mit pBE-2 kreuzhybridisierenden Plasmiden zu erhalten, wurde eine Computer-Literatursuche durchgeführt (Dr. Marquardt, Höchst AG/Frankfurt). Durch die hierbei erhaltenen Informationen bestand nun auch die Möglichkeit, die Homologie zu R538 und N3 näher zu untersuchen und Rückschlüsse auf die Funktion von pBE-2 zu ziehen. Eine Übersicht über die mit pBE-2 verwandten Plasmide findet sich in Tab. 4.10. -2.

4.10.2 Homologie von pBE-2 zu R751

Homologie auf R751

Da R751 das am besten untersuchte der mit pBE-2 kreuzhybridisierenden Plasmide ist, wurde eine nähere Charakterisierung der Homologie zunächst mit diesem Plasmid durchgeführt.

Hierzu wurden 12 *SphI* Subklone und ein *NotI* Subklon des Plasmids R751 in den Vektoren pBR329 und pJF119EH verwendet (Tab. 4.10. -3), welche von Herrn Dr. Lanka freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23



Abb. 4.10.-1:

Hybridisierung der Plasmide L1-L25 mit ^{32}P -pBE-2

Bezeichnung	Plasmid	Antibiotikaresistenz*	Hybridisierung mit ^{32}P -pBE-2
L1	RP4	Amp	—
L2	R7k	Amp	—
L3	R6k	Amp	—
L4	R7kTN4	Amp	—
L5	R538-10c	Kana	+
L6	R55	Kana	+
L7	R387	Kana	+
L8	R124	Tet	—
L9	R751	Trimet	+
L10	R721	Trimet	—
L11	s.-a.	Kana	+
L12	TP114	Kana	—
L13	RTS-1	Kana	—
L14	TP114drp1	Kana	+
L15	ColV2ED56	—	—
L16	R621a	Tet	—
L17	N3	Tet	+
L18	R27	Tet	—
L19	RA1	Tet	—
L20	BW66 (R144)	Kana	—
L21	BW61 (R144ara3)	Kana	—
L22	240a	Kana	—
L23	R112	Kana	—
L24	R391	Kana	—
L25	R906	Amp	+
—	pBR322	Amp	—
—	pUC12	Amp	—
—	CAT-Gen/pUC12	Amp	—

Tab. 4.10.-1:

Übersicht über die auf Homologie zu pBE-2 getesteten Plasmide;

*: Angegeben ist jeweils nur die im Labor verwendete Antibiotikum-Resistenz.

Amp: Ampicillin; Kana: Kanamycin; Tet: Tetracyclin; Trimet: Trimethoprim;

Inc. Gruppe	Wirt	Antibiotika-Marker	Biologische Funktion	Literatur
R538 (88 kb)	E. coli	Streptomycin Sulfadiazin Chloramphenicol Kanamycin	Tra Hg-Resistenz	Hollingshead & Vapnek, 1984; Alton & Vapnek, 1978; 1979
R751 (48 kb)	Breiter Wirtsber.	Trimethoprim	Tra Primase	Pansegrau & Lanka, 1987 Lanka & Barth, 1981 Ward & Grinsted, 1982 Grinter, 1983
s.-a. (37 kb)	Breiter Wirtsbereich	Sulfonamid Chloramphenicol Kanamycin Streptomycin	Tra	Watanabe et al., 1968
TP114drp1	—	Kanamycin	—	—
N3 (47 kb)	Breiter Wirtsbereich	Tetracyclin Streptomycin Sulfonamid	Tra DNA-Repair Restriktion Modifikation	Ando & Arai, 1981 Bradley, 1979
R387	Inc K	Kanamycin	Primase	Lanka & Barth, 1981 Dalrymple & Williams, 1984
R906 (55 kb)	Begrenzt breiter Wirtsbereich	Ampicillin Streptomycin Sulfonamid	Hg-Resistenz Tra	Sakanyan, 1986 Ward & Grinsted, 1982 Smith & Thomas, 1987
R55	Inc C	Kanamycin		Bukhari et al., 1977

Tab. 4.10.-2: Übersicht über die mit pBE-2 verwandten Plasmide

Hierzu wurden 12 *Sph*I Subklone und ein *Not*I Subklon des Plasmids R751 in den Vektoren pBR329 und pJF119EH verwendet (Tab. 4.10. -3), welche von Herrn Dr. Lanka freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

Ca. 300 ng DNA dieser Subklone wurde ungespalten auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen und nach Transfer auf NC-Filter mit radioaktiv markiertem pBE-2 Plasmid hybridisiert. Als Negativ-Kontrolle dienten die Vektoren pBR329 und pJF119EH ohne Insert. Die Autoradiographie (Abb. 4.10.-2) zeigt, daß der *Not*I-Subklon pMS272 (*Not*I B-Fragment) und die *Sph*I Klone pMS254 (*Sph*I-Fragment D), pMS256 (*Sph*I-Fragment F) und pMS259 (*Sph*I-Fragment I) gegen pBE-2 hybridisieren.

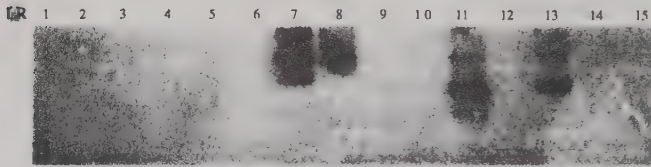


Abb. 4.10.-2: Hybridisierung der *Sph*I Subklone von R751 mit ^{32}P -pBE-2

Bez.	Subklon	Fragment	Vektor	Hybr.-pBE-2
LR1	—	—	pBR322	—
LR2	pMS453	<i>Sph</i> I C	pJF119EH	—
LR3	pMS262	<i>Sph</i> I L	pBR329	—
LR4	pMS263	<i>Sph</i> I M	pBR329	—
LR5	pMS251	<i>Sph</i> I A	pBR329	—
LR6	pMS262	<i>Sph</i> I K	pBR329	—
LR7	pMS272	<i>Not</i> I B	pBR329	+
LR8	pMS254	<i>Sph</i> I D	pBR329	+
LR9	—	—	pJF119EH	—
LR10	pMS255	<i>Sph</i> I L	pBR329	—
LR11	pMS259	<i>Sph</i> I I	pBR329	+
LR12	pMS452	<i>Sph</i> I B	pJF119EH	—
LR13	pMS256	<i>Sph</i> I F	pBR329	+
LR14	pMS457	<i>Sph</i> I G	pJF119EH	—
LR15	pMS265	<i>Sph</i> I O	pBR329	—

Tab. 4.10.-3:

Übersicht über die auf Homologie zu pBE-2 getesteten Subklone von R751;

Wie aus der Restriktionskarte von R751 (Abb. 4.10.-4) zu ersehen ist, ist derjenige Bereich von R751 zu pBE-2 homolog, welcher das Transposon Tn402 enthält. Dieses Transposon kodiert Trimethoprim-Resistenz (Dihydrofolat-Reductase). Interessanterweise enthält dieser Abschnitt auch einen der beiden Cluster für Restriktionsschnittstellen auf R751 (vgl. Abb. 4.10.-4).

Homologie auf pBE-2

Um die Homologie auf dem Plasmid pBE-2 zu charakterisieren, wurde in umgekehrter Weise vorgegangen. DNA des Plasmids pBE-2 wurde mit den Enzymen *EcoRI*, *HincII* und *AvaI* gespalten und wie üblich nach elektrophoretischer Auftrennung auf NC-Filter übertragen. Nach Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA des Subklons pMS272, welcher das *NotI* B-Fragment aus R751 und somit den gesamten zu pBE-2 homologen Bereich enthält, zeigte die Autoradiographie (Abb. 4.10.-3), daß die pBE-2 Fragmente E5 bzw. E5a, E7, A4, A5 (schwächer), A18 und A20 sowie H4 und H2 hybridisierten.

.B A H E

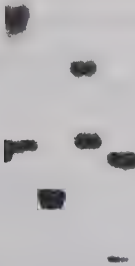


Abb. 4.10.-3:
Hybridisierung von pBE-2
Restriktionsfragmenten mit
 ^{32}P -pMS272 (*NotI* B-Frag-
ment von R751).

B: *BamHI*; A: *AvaI*;
H: *HincII*; E: *EcoRI*;

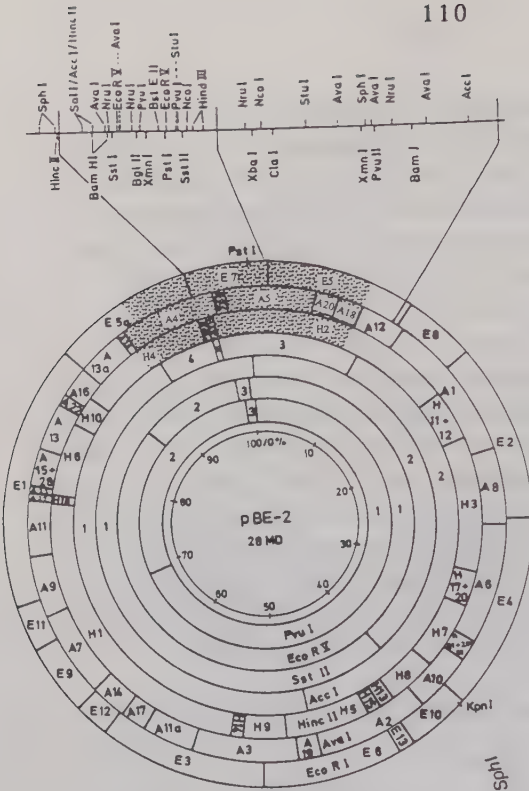
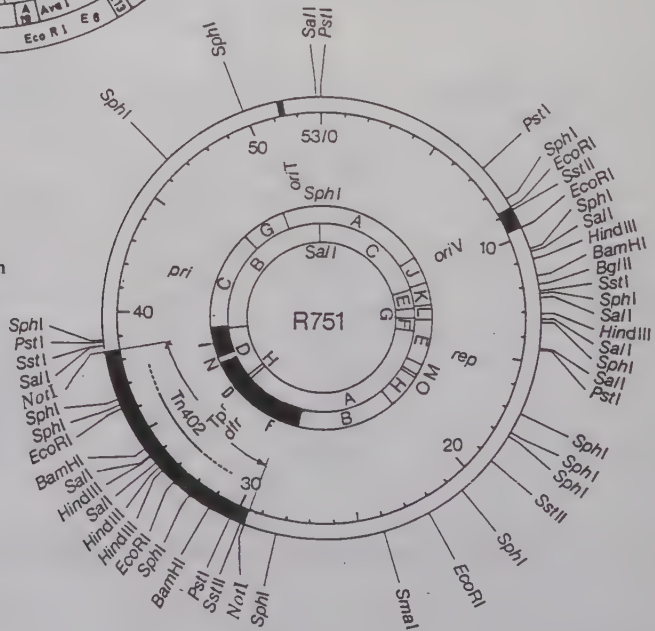


Abb. 4.10. 5:
Restriktionskarte von pBE-2;

Der zu R751 homologe Bereich ist
gepunktet dargestellt.

Abb. 4.10. -4:
Restriktionskarte von R751;
Der zu pBE-2 homologe Bereich
ist schwarz dargestellt.



Daneben hybridisierten beide *Bam*HI-Fragmente. Die Zuordnung der Fragmente erfolgte durch Nachhybridisieren des NC-Filters mit radioaktiv markiertem pBE-2. Da die Fragmente A12 und A13 eindeutig nicht hybridisieren, ist eine relativ genaue Eingrenzung des homologen Abschnitts möglich.

Auf beiden Plasmiden hat der homologe Bereich jeweils eine Größe von etwa 8 kb. Wie aus der Restriktionskarte von pBE-2 (Abb. 4.10.-5) zu entnehmen ist, fällt der zu R751 homologe Abschnitt mit dem einzigen auf dem Plasmid pBE-2 vorhandenen Cluster für Restriktionsschnittstellen zusammen.

Das Plasmid pBE-2 weist also in einem ca. 8 kb großen Bereich hohe Homologie zu R751 bzw. zum Transposon Tn402 auf, welches zwar seit langem bekannt ist (Shapiro & Sporn, 1977), doch bislang wenig untersucht wurde und derzeit von verschiedenen Arbeitsgruppen eingehender bearbeitet wird (Dr. Lanka, pers. Mitteilung).

Eine Identität von R751 und pBE-2 in oben beschriebenem Bereich liegt allerdings nicht vor, da Schnittstellen für Restriktionsenzyme zwar jeweils als Cluster vorliegen, jedoch in ihrer Abfolge nicht übereinstimmen. Ein ähnlicher Fall liegt bei der Verwandtschaft von R751 mit RP4 vor (Pansegrau & Lanka, 1987). RP4 zeigt jedoch unter stringenten Bedingungen mit pBE-2 keine Kreuzhybridisierung (Abb. 4.10.-1).

Ob die Trimethoprim-Resistenz der *M. clara* -Stämme durch die Dihydrofolat-Reductase (DHFR) eines dem Tn402 verwandten Gens auf pBE-2 hervorgerufen wird, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Das DHFR-Gen aus R751 wurde inzwischen sequenziert (Flensburg & Steen, 1986) und besitzt eine Länge von 740 bp.

4.10.3 Homologie von pBE-2 zu R538

DNA des Plasmids R538 wurde mit den Enzymen *Eco*RI, *Hind*III, *Bam*HI und *Pst*I gespalten, auf einem 0,7% Agarosegel aufgetrennt, auf NC-Filter übertragen und gegen radioaktiv markierte DNA von pBE-2 hybridisiert (Abb. 4.10.-6). Die durch oben genannte Spaltungen gebildeten und gegen pBE-2 hybridisierenden Fragmente sind in die teilweise funktionelle Restriktionskarte von R538 (Alton & Vapnek, 1979b) eingetragen (Abb. 4.10.-7). Demnach sind jene Fragmente von R538 zu pBE-2 homolog, die für Sulfadiazin und

Streptomycin kodieren *EcoRI* D; *BamHI* B; *HindIII*, D,C; *PstI* B;). Daneben zeigt auch ein Bereich Homologie, der durch das *EcoRI*-Fragment C eingegrenzt ist. In diesem Abschnitt liegen nicht näher charakterisierte Transfer-Funktionen von R538. Weitergehende Untersuchungen wurden nicht mehr durchgeführt.

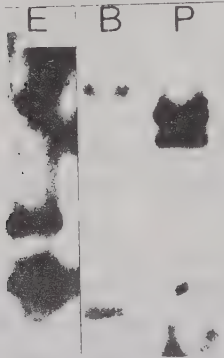


Abb. 4.10. -6:
Hybridisierung von Restriktionsfragmen-
ten des Plasmids R538 mit ^{32}P -pBE-2;
E: *EcoRI*; B: *BamHI*; P: *PstI*;

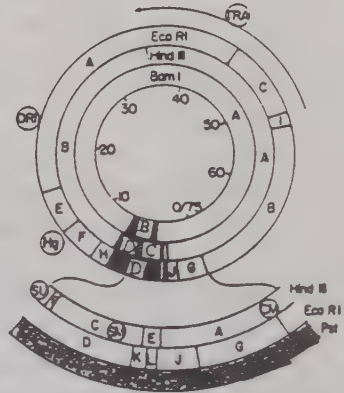


Abb. 4.10. -7:
Restriktionskarte von R538
(Alton & Vapnek, 1979):
Der zu pBE-2 homologe Be-
reich ist grau eingezeichnet;

4.10.4 Homologie von pBE-2 zu N3

Wie im Fall von R538 wurden geblottete Restriktionsfragmente des Plasmids N3 (*PstI*, *BamHI*, *SalI*) mit radioaktiv markiertem pBE-2 hybridisiert. (Abb. 4.10.-8).

Die zu pBE-2 homologen Fragmente (*BamHI*, 4; *SalI*, 3) sind in die Restriktionskarte von N3 (Ando & Arai, 1981) eingezeichnet (Abb. 4.10.-9). Für *PstI* ist keine vollständige Restriktionskarte vorhanden. Auch bei Plasmid N3 umfassen die zu pBE-2 homologen Fragmente jenen Bereich, der für Streptomycin und/oder Sulfonamid-Resistenz kodiert.

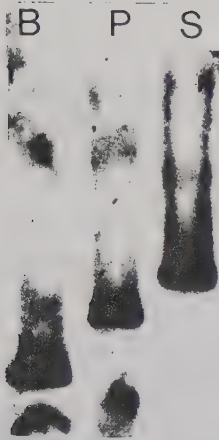


Abb. 4.10.-8:
Hybridisierung von Restriktionsfrag-
menten des Plasmids N3 mit ^{32}P -pBE-2;
B: *Bam*HI; P: *Pst*I; S: *Sal*I;

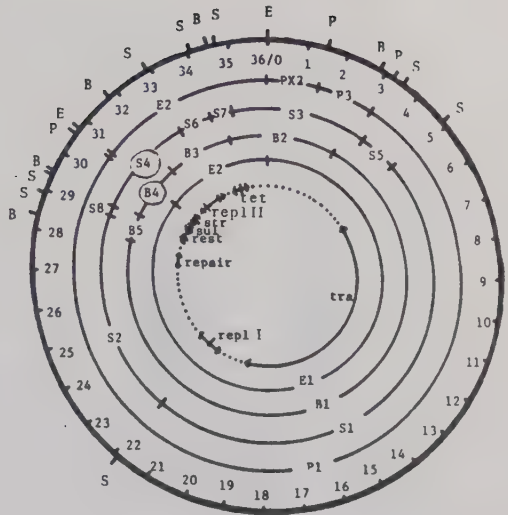


Abb. 4.10.-9:
Restriktionskarte von N3
(Ando & Arai, 1981);
Die zu pBE-2 homologen Frag-
mente sind durch Kreise gekenn-
zeichnet;

4.10.5 Homologie von pBE-2 zu R906

Aufgrund der Verwandtschaft vieler IncP-1 Plasmide (Smith & Thomas, 1987) und der Homologie von pBE-2 zu R751 (IncP-1) wurde ein weiteres IncP-1 Plasmid, nämlich R906 (Sakanyan, 1986) auf Kreuzhybridisierung mit pBE-2 untersucht. R906 kodiert unter anderem für Quecksilber-Resistenz.

Wie üblich wurden hierzu geblottete Restriktionsfragmente von R906 (*Eco*RI, *Bam*HI und *Hind*III) mit radioaktiv markiertem pBE-2 hybridisiert (Abb. 4.10.-10). Die Restriktionskarte von R906 (Abb. 4.10.-11) zeigt, daß auch hierbei dasjenige Fragment (nämlich *Bam*HI-Fragment C), welches für Sulfonamid-Resistenz kodiert, mit pBE-2 hybridisiert. Da bei *Bam*HI-Spaltung nur Fragment C (3,7 kb) hybridisiert, sind offensichtlich keine weiteren Homologien vorhanden (keine Quecksilber-Resistenz). Auch das

*Eco*RI-Fragment D, auf dem ein Gen für Streptomycin-Resistenz liegt, hybridisiert nicht.

Die Hybridisierung der großen *Eco*RI-Fragmente A und B, sowie der *Hind*III Fragmente A und B resultiert also nur aus der Homologie im Bereich des *Bam*HI Fragments C (vgl. Abb. 4.10.-11).



Abb. 4.10. -10:
Hybridisierung von Restriktions-
fragmenten des Plasmids R906 mit
³²P-pBE-2;
E: *Eco*RI; B: *Bam*HI; H: *Hind*III;

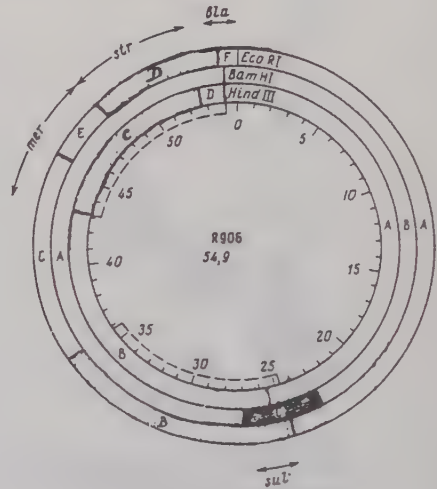


Abb. 4.10.-11:
Restriktionskarte von R906
(Sakanyan, 1986);
Der zu pBE-2 homologe
Bereich ist grau dargestellt;

Da bei den Plasmiden N3. und R538 die Gene für Streptomycin und Sulfonamid eng benachbart sind, liegt aufgrund der Hybridisierungsdaten von R906 die Vermutung nahe, daß auf pBE-2 in diesem Bereich lediglich das Gen für Sulfonamid-Resistenz vorhanden ist, zumal keiner der *M. clara*-Stämme Streptomycin Resistenz zeigt.

Eine weitere Kartierung der entsprechenden Homologien auf dem Plasmid pBE-2 und funktionelle Untersuchungen mit subklonierten pBE-2 Fragmenten aus diesen Bereichen könnten weiteren Aufschluß geben über biologische Funktion der Plasmide und des im Genom des Stammes *M. clara* BE-1 integrierten Plasmidanteils.

5. DISKUSSION

5.1 Transkription der Plasmide in *M. clara* und *E. coli*

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Hybridisierung geblotteter Restriktionsfragmente der Plasmide pBE-2 und pBE-3 mit radioaktiv markierter Gesamt-RNA aus den Stämmen *M. clara* BE-2 und BE-3 eine Transkriptionskarte der kryptischen Plasmide erstellt. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierter RNA hat gegenüber dem üblicherweise angewandten Northern Blot Verfahren in diesem Fall den Vorteil, daß auf einfache Weise ein Überblick über die Verteilung der Transkriptionsaktivitäten auf den 16 bzw. 46 kb großen Plasmiden erhalten werden kann. Da sämtliche RNA Moleküle statistisch gleichmäßig *in vitro* radioaktiv markiert werden, ist die auftretende Hybridisierungs- bzw. Signalintensität in erster Näherung proportional der *in vivo* Anzahl der jeweiligen RNA Spezies. Die Spezifität der Hybridisierung konnte durch mehrere Kontrollexperimente gezeigt werden: i) Im Gegensatz zu einzelnen pBE-3 und pBE-2 Banden hybridisierten weder linearisiertes pBR322 noch extrem GC reiche Plasmide (pMH4; P9); ii) radioaktiv markierte pBE-2 und pBE-3 Plasmide hybridisierten im Northern Blot nicht gegen RNA aus Stämmen, welche diese Plasmide nicht enthielten; iii) eine Hybridisierung durch Plasmidkontamination der isolierten RNA konnte aufgrund der Intensitätsverteilung der auftretenden Banden ausgeschlossen werden.

Auf beiden Plasmiden wird derselbe Bereich - Fragment E3 von pBE-3 bzw. Fragment E9 von pBE-2 - um etwa eine Größenordnung stärker transkribiert als der restliche Teil (das Plasmid pBE-3 stellt eine colineare Deletionsmutante von pBE-2 dar). Während bei pBE-3 nur für Fragment E5 keine Transkription beobachtet werden konnte, scheint etwa die Hälfte des Plasmids pBE-2 transkriptionsinaktiv. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß auch in diesen Bereichen eine sehr schwache Transkription stattfindet, da die Empfindlichkeit des hier angewandten Verfahrens unter der von Northern Blot Analysen liegt. Möglicherweise kann die Transkription dieser Bereiche durch Stimuli induziert werden. Induktionen dieser Art sind häufig zu finden, z.B. beim Tetracyclin-Resistenzgen von Plasmid pSC101 durch subinhibitorische Konzentrationen an Tetracyclin (Tait & Boyer, 1978), beim Lactose Operon durch Allolactose und IPTG oder dem SOS-System bei *E. coli* durch UV-Bestrahlung oder Hitzeschock (Little & Mount, 1982).

Die Halbwertszeit bakterieller mRNA's beträgt im Durchschnitt nur 2-3 min (Gabain et al., 1983), jedoch sind auch längerlebige Spezies wie Transkripte des *ompA*- und *lpp*-Gens mit Halbwertszeiten von 15-20 Minuten bekannt, wobei der Abbau der mRNA stark von den Wachstumsbedingungen abhängt (Nilsson et al., 1984).

Die Möglichkeit, daß das starke RNA Hybridisierungssignal im Bereich des Fragments E3 nicht ausschließlich durch hohe Transkription eines äußerst starken Promotors, also durch eine große Anzahl an RNA Molekülen bedingt wird, sondern durch eine überdurchschnittlich lange Halbwertszeit der entsprechenden RNA, konnte nicht völlig ausgeschlossen werden, zumal mögliche stabilisierende Sequenzen (siehe 4.6.-3) am 3'-Ende der entsprechenden mRNA aufgefunden wurden. Der Abbau von mRNA (Brawermann, 1987) erfolgt nämlich hauptsächlich durch Exonukleasen vom 3' Ende aus (Hayashi & Hayashi, 1985). Umgekehrte Repetitionen am 3' Ende eines Gens, können auf RNA-Ebene leicht zur Ausbildung von "Haarnadelstrukturen" führen und die mRNA gegen exonukleolytischen Abbau schützen (Wong & Chang, 1985). Derartige stabilisierende Strukturen, welche auch stromaufwärts des Terminationsbereichs von Fragment E3 auftreten, könnten somit die Halbwertszeit dieser mRNA deutlich verlängern.

Da jedoch Dr. Marquardt in einem von der Stabilität des E3 Transkripts unabhängigen Experiment mit dem "Promotor-probe"-Plasmid pKK232-8 (Brosius et al., 1984) durch "shot gun" Klonierung des gesamten pBE-3 Plasmids genau jenes Promotorfragment aus E3 als das aktivste (Resistenz gegen hohe Konzentrationen an Chloramphenicol in pKK232-8) auffand, konnte geschlossen werden, daß das starke RNA-Hybridisierungssignal im Bereich von Fragment E3 (4.1) hauptsächlich durch einen sehr aktiven Promotor bedingt wird und nicht in erster Linie durch eine überdurchschnittlich lange Lebensdauer der entsprechenden RNA.

Die oben genannten Hybridisierungsexperimente wurden auch im *E. coli* System durchgeführt. Während in *E. coli* keine Expression der Plasmide aus *M. clara* beobachtet werden konnte (Marquardt, 1983), zeigten die RNA-Hybridisierungen jedoch relativ hohe Transkriptionsaktivität des in pBR322 klonierten pBE-3 Plasmids.

Wiederum ergab Fragment E3 (pBE-3) das stärkste Signal, jedoch wird auch Fragment E2 (pBE-3) in *E. coli* relativ stark transkribiert. Auf diesem Fragment, welches für die Plasmidreplikation in *M. clara* essentiell ist (ori-

Bereich), könnten Repressor-Proteine für die Transkription im ori-Bereich kodiert werden. Da *E. coli* offensichtlich Gene aus *M. clara* nicht exprimieren kann, ist die erhöhte Transkription des Fragments E2 in *E. coli* möglicherweise auf das Fehlen regulatorischer Proteine zurückzuführen, welche in *M. clara* Replikation und Kopienzahl der Plasmide kontrollieren und die dafür eventuell nötige Transkription der Primer-RNA (Tomizawa, 1984) abschwächen. Beispielsweise wirkt das Initiator-Protein der Plasmidreplikation bei pSC101 als Repressor der eigenen Transkription (Vocke & Bastia, 1985).

5.2 Transkriptionselemente in *M. clara* und mögliche Regulationsmechanismen

Da durch obige Versuche gezeigt werden konnte, daß die *E. coli* RNA Polymerase Promotoren aus *M. clara* erkennt, bestand die Möglichkeit, durch DNA-Sequenzierung des Fragments E3 und Vergleich mit den *E. coli* Konsensus Sequenzen von σ^{70} - (Hawley & McClure, 1983) und σ^{32} - Promotoren (Cowing et al., 1985), entsprechende Elemente in *M. clara* zu identifizieren.

Konsensus-Sequenzen der Transkriptionselemente

Insgesamt wurden sechs Bereiche aufgefunden, in denen sämtliche hochkonservierten Nukleotide der Konsensus Sequenz für σ^{70} -Promotoren vorhanden sind. In allen Fällen folgt auf die Pribnow-Box (Pribnow, 1975) im üblichen Abstand von 5-9 Basen (Lewin, 1987) ein Adenosin-Nukleotid als potentieller Startpunkt der mRNA.

Der für die Promotorstärke wichtige Abstand von -10 und -35 Box wird in Zusammenfassung der bekannten Literatur mit 15-18 Basen (Winnacker, 1987) und 16-19 Basen (Lewin, 1987) angegeben. Bei Promotor pRb liegt dieser Abstand mit 19 Basen somit an der für bakterielle Promotoren äußersten Grenze. Bei Erweiterung der Distanz auf 20 Basen tritt bei *E. coli* Promotoren eine drastische Verringerung der Aktivität auf (sog. "down mutation"), jedoch sind auch solche Promotoren in begrenztem Umfang funktionsfähig (Peschke et al., 1985). Der mit pL* bezeichnete Promotorbereich könnte also - mit einem Abstand von 20 Basen zwischen den beiden Boxen - eventuell noch von RNA-Polymerasen erkannt und benützt werden.

Promotor	-35	Abstand	-10	Abstand zum Adenosin-Nukleotid
pL	TTGCGT	16 bp	TAA AAT	7 bp
pRa	TTGGTT	16 bp	TATGTT	7 bp
pRb	TTGIGT	19 bp	TATTTT	7 bp
pLa*	TTGCGC	18 bp	TAGTTT	7 bp
pLb*	TTGACG	17 bp	TAGAAT	6 bp
pR*	TTGCCT	20 bp	TATTCT	7 bp
<i>E. coli</i> lacZ	TTTACA	18 bp	TATGTT	6 bp
Konsensus	TTGACA	15-19 bp	TATAAT	5-9 bp
(<i>E. coli</i>)	82 78 54		80 45 50	
	84 65 45		95 60 96	

Tab.: 5.2.-1:

Übersicht über Sequenzen der -35 und -10 Regionen von *M. clara* Promotoren (p); Zahlen unter den Nukleotiden der *E. coli* Consensus-Sequenz geben die Konservierung der jeweiligen Base in % an (Lewin, 1987). Buchstaben in Fettdruck geben hochkonservierte Nukleotide an.

Aus Tab. 5.2. -1 geht hervor, daß der Abstand zwischen den -10 Boxen und den Transkriptionsstartstellen der einzelnen *M. clara* Promotoren hoch konserviert ist (7 Basen). Alle gefundenen *M. clara* Promotoren stimmen in der -10 Box und der -35 Region in denjenigen Nukleotiden mit der bakteriellen Consensus Sequenz (*E. coli*) überein, bei welchen die Konservierung mehr als 65% beträgt. Beispielsweise ist die -10 Box des Promotors pRa mit derjenigen des lacZ Promotors aus *E. coli* identisch (vgl. Tab. 5.2. -1). Obwohl pLb* in der -10 und der -35 Region jeweils nur in einer schwach konservierten Base von der *E. coli* Consensus-Sequenz abweicht und auch den optimalen Abstand von 17 Basen zwischen diesen Boxen besitzt, ist dieser Promotor offensichtlich nur schwach aktiv oder völlig abgeschaltet. Dies spricht für eine effiziente Regulation der Transkriptionseinheit von Fragment E3.

Interessanterweise sind auf Fragment E3 je drei der obigen Promotoren überlappend angeordnet (jeweils mit P oder P* bezeichnet).

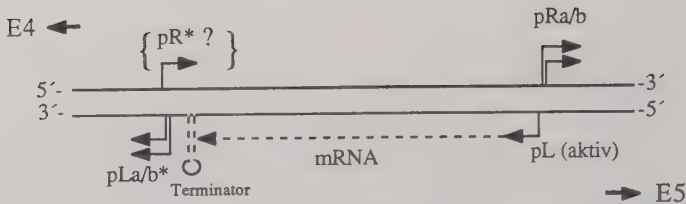


Abb. 5.2. -2: Schematische Darstellung der Anordnung von Promotoren auf Fragment E3 (P- und P*-Region).

Die Promotoren pRa und pRb bzw. pLa* und pLb* liegen jeweils direkt hintereinander, wobei im Falle der pR-Promotoren die -35 Regionen in 2 Basen überlappen (Abb. 5.2. -1a, oberer Strang). Ein ähnlicher Fall wurde auch bei mehreren *E. coli* Operons gefunden (Caillet et al., 1985; Reitzer & Magasanik, 1985). Alle diese Promotoren sind über verschiedene Mechanismen gegenseitig reguliert. Beispielsweise konnte beim gal Operon aus *E. coli*, wo die -10 Regionen zweier Promotoren (galP1/P2) in einer Base überlappen (Bingham et al., 1986), gezeigt werden, daß die Aktivität beider Promotoren durch die Konzentration an c-AMP bestimmt wird. Durch Bindung des cAMP-CRP(CAP)-Komplexes an eine Operator-Region zwischen -30 und -50 (bezogen auf den Transkriptionsstart) wird Promotor galP2 blockiert und galP1 aktiviert. An diesem System wurde durch kinetische Messungen ein Modell für die Transkription überlappender Promotoren aufgestellt (Herbert et al., 1986). Im Falle der *M. clara* Promotoren pRa/pRb und pLa*/pLb* konnte zwar keine CAP-Bindestelle gefunden werden, doch sind auch hier alle Voraussetzungen für einen komplexen Regulationsmechanismus vorhanden (verschiedene Transkriptionsstartstellen und umgekehrte Repetitionen).

Ein weiterer Fall überlappender Promotoren liegt beim tsx Gen aus *E. coli* vor. Hier werden die hintereinanderliegenden Promotoren durch zwei verschiedene Repressoren, nämlich deoR und cytR blockiert und die gesamte Inaktivierung durch cAMP-CRP wieder aufgehoben (Bremer et al., 1988).

Auf dem hochtranskribierten Fragment E3 findet sich interessanterweise noch je ein weiterer Promotor auf dem anderen Strang (pL und pR*), welcher jeweils die beiden "tandem-Promotoren" überlappt. In beiden Fällen liegen die -10 Boxen der Promotoren um 1 Base verschoben untereinander (-10 von pRb über -10 von pL und -10 von pLb* über -10 von pR*). Es sind hier also zum einen jeweils zwei überlappende Promotoren auf dem einen Strang vorhanden,

welche zusätzlich divergierend mit je einem Promotor auf dem anderen Strang überlappen. Derartige überlappend divergierende Promotoren finden sich auch im gut untersuchten λ -System bei den Promotoren PR und PRM (Ptashne, 1986), den bioA und bioB Genen des Biotin Operons (Otsuka & Abelson, 1978), dem IS10 Element von Transposon Tn10 (Simmons & Kleckner, 1983) und den tetA und tetR Promotoren des Tetracyclin-Resistenzgens von Tn10 (Wissmann et al., 1986; Meier et al., 1988). In allen Fällen werden diese Promotoren gegenseitig reguliert. Während beispielsweise die Startstellen der Transkription von tetA und tetR 36 Basen voneinander entfernt sind, beträgt dieser Abstand bei den *M. clara* Promotoren pRa/b und pL nur 12 bp bzw. 19 Basen, bei pLa/b* und pR* 7 bzw. 18 Basen. Da ein RNA Molekül bei der Initiation der Transkription weitaus mehr als 20 Basen eines Promotors überdeckt (Siebenlist et al, 1980; Von Hippel et al., 1984), ist die Interaktion der RNA Polymerase mit den jeweiligen überlappend divergierenden Promotoren sicherlich wechselseitig ausgeschlossen.

Aktivität der Promotoren und mögliche Regulationsmechanismen durch RNA

Aus RNA-Hybridisierungsexperimenten (4.2.1) und Versuchen mit dem "Promotor-probe"-Plasmid (4.2.2), konnte geschlossen werden, daß die aus Fragment E3 in Richtung auf Fragment E5 transkribierenden Promotoren pRa und pRb abgeschaltet sind, während der in das Fragment E3 transkribierende Promotor pL sehr aktiv ist. Dies deutet auf eine umfangreiche Regulation dieses Plasmidbereichs hin.

Die hohe Transkriptionsaktivität auf Fragment E3 konnte durch Primer-Extension- und S1 Analysen dem Promotor pL zugewiesen werden. Sowohl in *E. coli* als auch in *M. clara* konnte ein Adenosin-Nukleotid im Abstand von 7 Basen zur -10 Region als der Hauptstartpunkt der Transkription identifiziert werden. Interessanterweise tritt bei *E. coli* neben dem auch in *M. clara* genutzten Adenosin-Nukleotid im Abstand von 17 Basen zusätzlich eine Startstelle im Abstand von 12 Basen auf, welche in *M. clara* nicht zu finden ist. Promotoren aus *M. clara* werden offensichtlich von der *E. coli*- und der *M. clara* RNA Polymerase - vermutlich aufgrund ähnlicher σ -Untereinheiten - effizient erkannt, doch weisen die RNA Polymerasen aus beiden Stämmen einen signifikanten Unterschied in den Startstellen der Transkription auf.

Für die mit P* bezeichnete Gruppe von Promotoren, die in einem Abstand von etwa 1400 Basen auf die mit P bezeichnete Gruppe folgt, wurden detailliertere

Untersuchungen nicht mehr durchgeführt. Aus den RNA Hybridisierungsexperimenten (schwaches Signal für *NotI* Fragment N2b, siehe 4.2.1, und schwache Hybridisierung von Fragment E4) kann aber gefolgert werden, daß beide überlappende Promotoren pLa* und pLb* nur schwach aktiv oder völlig abgeschaltet sind. Für die als pR* bezeichnete Struktur mit einem Abstand von 20 Basen zwischen -10 und -35 Region kann, falls überhaupt, nur schwache Aktivität angenommen werden. Hierbei ergäbe sich eine antisense RNA zu jenem Transkript des aktiven pL Promotors. Solche antisense Transkripte mit regulatorischen Funktionen sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene werden in Prokaryonten häufig beobachtet (Übersichtsartikel: Pines & Inouye, 1986), z.B. bei der Plasmidreplikation (Cesarini & Banner, 1985; Muesing et al., 1981), der Transkription bakterieller Gene und der mRNA-Translation in Bakterien, Bakteriophagen und Transposons. Auch die Transkription des schon erwähnten Transkriptionsregulator-Komplexes cAMP-CRP wird durch antisense RNA kontrolliert (Okamoto & Freundlich, 1986). Ein Fall von Translationsregulation durch eine antisense RNA liegt vermutlich bei der Transposase Expression von IS10 (Tn10) vor (Simmons & Kleckner, 1983). Da es sich bei der Transkription von Fragment E3 um ein System handelt, bei dem offensichtlich mehrere Promotoren voneinander abhängig reguliert werden, könnte auch hier ein antisense Transkript (pL/pR*) eine gewisse Rolle spielen.

Die Promotorregionen P und P* enthalten neben mehreren umgekehrten Repetitionen auch zahlreiche direkte Repetitionen (beispielsweise tritt die Sequenz 5'-GTTGT-3' 4x hintereinander bei pRa/b auf). Direkte Repetitionen, welche in Promotorregionen seltener auftreten, konnten auch im Promotor eines *Pseudomonas* Stammes aufgefunden werden (Deretic et al., 1987), doch bleibt auch hier deren biologische Funktion unbekannt.

Bedingt durch die Struktur der umgekehrten Repetitionen im Bereich der überlappend divergierenden Promotoren pL und pRa/b (Abb. 5.1. -1a) wäre ein potentielles RNA Transkript vom Promotor pRb in den ersten 12 Nukleotiden identisch mit der im Primer-Extension Verfahren nachgewiesenen RNA, welche vom Promotor pL aus startet. Der Abstand der Transkriptionsstartstellen dieser divergierenden Promotoren beträgt 12 Basen und entspricht in etwa der Helizität der DNA (10 Basen für B-DNA; 12 Basen für Z-DNA). Aufgrund dieser räumlicher Nähe könnte die von Promotor pL ausgehende RNA während der Transkriptionsinitiation ("open complex") mit

dem entsprechenden, komplementären DNA Strang stromaufwärts von pL (bzw. stromabwärts von pRb) hybridisieren. Möglicherweise verhindert diese Hybridisierung während der Bildung des sog. "open complex" den Start der Transkription vom Promotor pR aus. Untersuchungen über die Initiation der Transkription und die Bildung eines sog. "stressed intermediate" (Straney & Crothers, 1987) lassen auch diese Möglichkeit der Regulation in der P-Region als möglich erscheinen.

Beide Promotoren können aufgrund der vielfachen umgekehrten Repetitionen Sekundärstrukturen ausbilden (Abb. 4.3.-3 und 4.6.-3a), die ebenfalls an der gegenseitigen Regulation beteiligt sein könnten. Die Stabilität von Sekundärstrukturen hängt generell von der sie umgebenden DNA Sequenz ab, welche vor allem bei "supercoiled" DNA zu einer beträchtlichen Stabilisierung von "stem-loop"-Strukturen führen kann (Furlong & Lilley, 1986). *In vitro* ist deren Ausbildung stark vom Salzgehalt bzw. der Ionenstärke abhängig (Sullivan & Lilley, 1987), *in vivo* sicherlich auch von der Anwesenheit DNA bindender Proteine. Der Nachweis, ob eine wie in Abb. 4.3.3 gezeigte Struktur tatsächlich *in vivo* vorliegt, ist schwierig zu erbringen. Eine Identifizierung kann jedoch *in vitro* durch Diethylpyrocarbonat (Scholten & Nordheim, 1986), durch T4 Endonuklease VII oder "Gen 3 Endonuklease" von Bakteriophage T7 (de Massy & Weisberg, 1987), sowie durch besondere Gelelektrophoresen (Diekmann & Lilley, 1987) erfolgen. Tatsächlich treten bei nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese eines die Promotorregion P enthaltenden DNA-Fragments, abhängig von der Isolierungsmethode (Beeinflussung durch Temperatur) häufig mehrere Banden auf (Stiebler, pers. Mitteilung), was durchaus für das Vorhandensein von Sekundärstrukturen spricht.

Während die Ausbildung von "stem-loop"-Strukturen auf DNA-Ebene aufgrund der Konkurrenz zur geschlossenen, doppelsträngigen Form energetisch erschwert ist, können sich RNA-Sekundärstrukturen leicht bilden. Diese haben für die Regulation der Transkription z.B. beim Tryptophan-Operon große Bedeutung (Attenuationsmodell; Yanofsky, 1981; Landick & Yanofsky, 1987). Da die -35 Region des *M. clara* Promotors pLa* mit der vorangehenden Terminatorstruktur im Poly U Teil überlappt, kann auch in diesem Fall eine Kopplung von Termination und Transkription durch RNA-Sekundärstrukturen angenommen werden. Eine derartige Wechselwirkung von Termination und Initiation der Transkription im Bereich von P* würde beide

Promotorregionen über eine Distanz von etwa 1400 Basen regulatorisch verknüpfen.

*Operatorsequenzen auf den Promotorregionen P und P**

Bei vielen Promotoren und bei fast allen überlappend divergierenden Promotoren wird die Regulation der Transkription durch DNA bindende Proteine ausgeübt (Aktivatoren oder Repressoren), welche an sog. Operatoren binden (Übersichtsartikel: Takeda et al., 1983; Pabo, 1984; Echols, 1985). Diese haben meist palindromische Sequenzen, jedoch treten in seltenen Fällen auch Operatoren ohne Rotationssymmetrie auf (van Kaer et al., 1988). Operatorregionen können stromabwärts vom Promotor liegen wie beim lac System (Gilbert et al, 1976), ihre Promotoren vollständig überlappen wie im Fall des trp Operons (Bennett & Yanofsky, 1978) oder des λ -cI Systems (Ptashne, 1978), aber auch stromaufwärts vom Promotor liegen wie beim gal Operon (Adhya & Miller, 1979). Eine strukturelle Analyse der Promotorregionen P und P* ergibt jeweils vielfache Palindrome, die als mögliche Bindestellen für Aktivatoren und Repressoren fungieren können (Abb. 5.1.-1). Bei der P-Region können diese potentiellen Bindestellen sowohl die Promotoren überlappen als auch stromabwärts liegen, bei der P* Region zusätzlich auch stromaufwärts der Promotoren (Abb. 4.6. -3a und 5.1.-1b). Ein weiteres Charakteristikum der P, jedoch nicht der P* Region, ist eine Nukleotidabfolge von 22 T und G Basen von der -35 bis zur -10 Box des pRA Promotors und eine ausschließlich aus A und C Nukleotiden bestehende, auf die -10 Box von Promotor pRb folgende Sequenz. Soweit hier bekannt, wurde eine derartige Promotorstruktur noch nicht beschrieben. Möglicherweise kann diese Sequenz durch Veränderung der DNA-Helix die oben erwähnte Bildung von "stem loop"-Strukturen erleichtern.

In der Promotorregion P ist das Palindrom 5'-TGTTGT/ACAACA-3' zweimal vorhanden. Multiple, identische Operatorstellen wurden auch bei anderen Promotoren gefunden: im schon erwähnten λ -System, bei den *E. coli* Operons gal (Irani et al., 1983), araBAD (Dunn et al, 1984), deo (Valentin-Hansen et al., 1985; 1986) und auch im lac System (Besse et al., 1986). Im gal und lac Operon liegt die zweite Operatorsequenz in den kodierenden Regionen. Müller-Hill und Bujard konnten zeigen, daß Transkriptions-Repression auch ohne direkte sterische Hinderung der RNA Polymerase während des Initiationsvorgangs stattfinden kann (Bess et al, 1986). Repressoren wirken

also auch als Transkriptions-Terminatoren (Deuschle et al., 1986). Somit könnte auch das stromabwärts von Promotor pRa und pRb gelegene Palindrom 5'-GGCC/GGCC-3' durch Bindung eines Repressors die Transkription dieser Promotoren abstellen.

Zu erwähnen ist weiterhin das Strukturelement TTG-N₆₋₁₀-ACA, welches von Gicquel-Sanzey & Cossart (1982) als Teil der Konsensus-Sequenz für die Bindestellen von lacI, crp, araC, lexA und galR vorgeschlagen wurde. In der Form TTG-N₆-ACA findet sich dieses Element auch als Teil eines Palindroms in den -10 Boxen der blockierten *M. clara* Promotoren pRa und pRb. Diese offensichtlich hochkonservierte Struktur fungiert in Form von TTG-N₁₀-ACA im Nitrogen-Regulationssystem (ntr) von *Bradyrhizobium japonicum* als proteinbindende Sequenz stromaufwärts des Promotors und wirkt dort orientierungs- und distanzunabhängig als Transkriptionenhancer (Alvarez-Morales et al., 1986).

Ein Vergleich der Promotorregionen P und P* mit bekannten Operator-Regionen ergibt eine signifikante Homologie zur Bindungsstelle des autoregulierten Tryptophan Repressors (trpR) in der Kontrollregion des Tryptophan Operons (Yanofsky et al., 1981) und des Tryptophan-Repressor-Gens. Der Operator des trp-Repressor-Gens besitzt sogar eine höhere Homologie zur Promotorregion P aus *M. clara* als zum Operator des durch diesen Repressor regulierten Tryptophan-Operons (Abb.5.2. -1). Die in dieser Abbildung dargestellten Sequenzen der aroH-, trp- und trpR-Operatoren sowie deren Sequenzvergleich ist dem Lehrbuch "Genes III" von Lewin (1987) entnommen. Die in allen fünf Operatorbereichen identischen Basen stellen für die Bindung der Repressoren offensichtlich wichtige und hochkonservierte Bereiche dar. Es ist also anzunehmen, daß die gefundenen Promotoren aus *M. clara* unter anderem durch Proteine reguliert werden, welche mit dem Tryptophan-Repressor aus *E. coli* (Squires & Yanofsky, 1975) verwandt sind. Auffallend ist auch eine Homologie der -35 Region des aktiven Promotors pL mit der Bindestelle des Transkriptions-Aktivators cII des Phagen λ (Ho et al., 1983; Ho et al., 1988), welcher an die -35 Region bestimmter λ -Promotoren bindet und deren Transkription stark erhöht:

λ -cII-Bindestelle (-35 Region):	5'-TTGC-N ₆ -TTGC-3'
<i>M. clara</i> pL (-35 Region):	5'-TTGC-N ₅ -TTGT-3'

Möglicherweise wird also die hohe Transkription des Promotors pL durch ein dem λ -cII Aktivator ähnliches Protein bedingt, und die Transkription der Promotoren pRa/b und pLa/b* durch ein mit dem trp-Repressor verwandtes Molekül abgeschaltet.

Insgesamt scheint es sich beim hochtranskribierten Fragment E3 um eine komplex regulierte Transkriptionseinheit mit mehreren möglichen Regulationsmechanismen zu handeln.

5.3 *M. clara* als mögliches Expressionssystem

Translationselemente

Mit Ausnahme des Promotors pL* folgen auf alle Promotoren des Fragments E3 ribosomale Bindungsstellen (RBS), sog. Shine-Dalgarno (SD) -Sequenzen (Shine & Dalgarno, 1975), deren Bedeutung für die Translation in jüngster Zeit auch direkt in vivo nachgewiesen wurde (Jakob et al., 1987). SD-Sequenzen können relativ stark variieren, so daß eine Konsensus Sequenz nur schwer abzuleiten ist. In fast allen bisher beobachteten Fällen geht jedoch eine purinreiche Nukleotidfolge in einem Abstand von 6-9 Basen dem ATG-Codon voraus.

Promotor	SD-Sequenz	Abstand zum ATG Codon	Abstand zum Transkriptionsstart
pRa/b	GAAGCG	10 bp	34 bp/41 bp
pL	GGAAGGAG	8 bp	42 bp
pLa/b*	AAGGAA	9 bp	108 bp
pR*	—		
λ pL	GAAGG		
Consensus (<i>E. coli</i>)	AGG	6-9 bp	variabel

Tab.: 5.3, -1: Übersicht über ribosomale Bindungsstellen der *M. clara* Promotoren;
 Unterstrichene Nukleotide geben den Bezugspunkt der Distanz zum Transkriptionsstart bzw. zum ATG-Codon an;
 Nukleotide in Fettdruck zeigen konservierte Basen an;

Die Grundsequenz, welche von Scherer et al., (1980) und Stormo et al., (1982) mit AGG-N₆-9-ATG angegeben wird, ist in den SD-Sequenzen der Promotoren pL und pLa/b* vollständig enthalten. Die Abfolge (G)AAG-N₈-10-ATG tritt in allen SD-Sequenzen der untersuchten *M. clara* Promotoren auf. Das Strukturelement 5'-GAAG-3' findet sich beispielsweise auch in der SD-Sequenz des λ pL Promotors. Im aktiven *M. clara* pL Promotor stimmt die SD-Sequenz sogar in 6 Basen mit dem 3'-Ende der 16S RNA von *E. coli* überein und besitzt damit eine größere Homologie als die meisten SD-Sequenzen von Promotoren aus *E. coli*:

16S RNA :	3'-OH	AU	UCC	UCC	5'
SD aus pL:		5'	AAG	GAG	3'

Eine weitere Regel, die ein Guanotin-Nukleotid an Position -3 verbietet, wird bei Promotor pL jedoch nicht befolgt. Eine andere Forderung für effiziente Shine-Dalgarno Sequenzen in *E. coli*, nämlich das Auftreten von weniger als zwei Guanotin Nukleotiden zwischen Position -1 und -7 wird bei pL und pRa/b* eingehalten, nicht jedoch bei pRa/b. Dort treten zwischen der SD-Sequenz und dem ATG Startcodon ausschließlich GC Reste auf, deren palindromische Anordnung (5'-CCGG/CCGG-3') die Ausbildung einer Sekundärstruktur oder die Bindung eines Repressors erlauben könnte. Auch stromabwärts des ATG Codons folgt ein Cluster von 16 G und C Basen, deren biologische Relevanz unbekannt ist.

Obwohl die zur Translation wichtigen Sequenzen zwischen *E. coli* und *M. clara* sehr ähnlich sind, werden Gene aus *E. coli* in *M. clara* offensichtlich nicht exprimiert (Marquardt, 1983). Möglicherweise spielen weitere DNA bzw. RNA Bereiche eine Rolle, die eine Translation in *E. coli* verhindern. Beispielsweise konnte gezeigt werden, daß ein 30 Basen stromaufwärts von der SD-Sequenz gelegener Abschnitt im *atpE* Gen die Expression von Interleukin 2 in *E. coli* um den Faktor 10 steigert (McCarthy et al., 1986). Auch das dem Startcodon folgende Triplet spielt bei Translation in *E. coli* eine wichtige Rolle und weicht normalerweise stark von der "codon usage" ab (Loomann et al., 1987).

Expression von Fremdprotein in methylophilen Stämmen

Ob methylophile Bakterien Transkriptions- und Translationselemente aus *E. coli* erkennen, ist nicht eindeutig geklärt. Unter Verwendung des *tac*-Promotors war die Expression eines Primase-Gens in *M. clara* BE-1 nicht oder

in kaum meßbarem Umfang möglich (Marquardt, pers. Mitteilung). Zwar konnte durch *E. coli*-Promotoren in *Methylophilus methylotrophus* Maudihydrofolat-Reductase (Hennam et al., 1982) und $\alpha 1$ Interferon (De Maeyer et al., 1982) in geringem Umfang transient exprimiert werden, doch wurden die Gene nach wenigen Teilungszyklen eliminiert. Auch die Konstruktion von *recA*⁻ Mutanten (Finch et al., 1986) führte bis jetzt offensichtlich nicht zum gewünschten Erfolg.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Expression von Fremdprotein unter Verwendung des Promotors (pL) und der entsprechenden Shine-Dalgarno Sequenz aus dem hochtranskribierten Plasmidfragment von *M. clara* BE-3 versucht. Während die Effizienz der Expression von β -Galaktosidase (Translationsfusion) bis jetzt nicht beurteilt werden kann, da die bei der Höchst AG durchgeführten Konjugationsexperimente noch nicht vollständig abgeschlossen sind, wurden beim IL-2 Expressionsvektor (Transkriptionsfusion) erste Untersuchungen im Western-Blot durchgeführt. Die hierbei erhaltenen Banden, welche etwa 1/20 - 1/40 der bei Expression unter Kontrolle des *tac*-Promotors in *E. coli* erhaltenen Proteinmenge entspräche, sind jedoch noch nicht eindeutig interpretierbar, da der verwendete Antikörper starke Kreuzhybridisierung mit anderen bakteriellen Proteinen zeigte. Weitere Versuche mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-2 (Firma Genzyme Corporation) könnten eine eindeutige Beurteilung erlauben.

Bei gleicher Promotorstärke und Translationseffizienz wie im *tac*-System (*E. coli*) wäre eine schwächere Expression mit dem hier verwendeten System durchaus zu erwarten, da die Kopienzahl der nativen *M. clara* Plasmide etwa um den Faktor 5-10 geringer ist als die von pUC-Vektoren.

Durch Verwendung des nun zur Verfügung stehenden Terminators aus Fragment E3 (vgl. 4.6.3) sollte eventuell eine Optimierung des Expressionssystems möglich sein, da hohe Transkription bekanntlich mit der Plasmidreplikation interferieren kann (Stueber & Bujard, 1982). Bedingt durch die angewandte Klonierungsstrategie, wurden vier Basen zwischen der SD-Sequenz und dem ATG Startcodon des IL-2 Gens ausgetauscht, die üblicherweise keinen Einfluß auf die Expressionseffizienz haben. Da jedoch in seltenen Fällen auch diese Sequenzen bei der Translation eine Rolle spielen (Fiers et al., 1980; Gheysen et al., 1982), könnten durch gezielte Mutagenese oder durch Klonierung eines Oligonukleotids die ursprünglichen Basen wieder

eingeführt und dadurch möglicherweise eine Verbesserung erzielt werden. Die Bildung von Sekundärstrukturen im Bereich der SD-Sequenz und des IL-2 Gens, welche ebenfalls die Translation stark beeinflussen können (Buell et al., 1985), ist aufgrund der vorliegenden Sequenz (siehe Anhang) nicht sehr wahrscheinlich.

Ein großes Problem bei der Expression von Fremdprotein in Bakterien ist der proteolytische Abbau des zu exprimierenden Proteins, beispielsweise durch die La Protease, deren Expression durch Fremdprotein induziert wird (Goff & Goldberg, 1985). Eine erstmals bei methylotrophen Bakterien am Stamm *Methylophilus methylotrophus* durchgeführte Messung der proteolytischen Aktivität (Chesshyre et al., 1987) zeigte eine starke Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Nährmediums, insbesondere der Methanolkonzentration, so daß eine Variation dieser Parameter zur Optimierung des Expressionssystems ebenfalls erforderlich erscheint.

Leserahmen auf Fragment E3

Trotz der in dieser Arbeit durchgeführten, vollständigen DNA-Sequenzierung des Fragments E3 bleibt die biologische Funktion des hochtranskribierten Plasmidanteils unbekannt, da weder auf DNA- noch auf Protein-Ebene eine signifikante Homologie zu bekannten Sequenzen der Datenbanken gefunden wurde. Das Fragment E3 weist zwei offene Leserahmen auf, welche ausgehend von den Promotoren pRa/b bzw. pLa/b* in die benachbarten Fragmente E5 bzw. E4 übergehen. Der "interne" Leserahmen, ausgehend vom transkriptionsaktiven Promotor pL, weist hingegen zahlreiche TGA-Stopcodons auf. Erst im "Loop" der Terminatorstruktur tritt ein TAA-Stopcodon auf. Da jedoch zwischen dem ATG-Startcodon und dem Stopcodon TAA ausschließlich TGA-Stopcodons auftreten, könnte es sich bei den *M. clara* Stämmen um TGA (opal) - Suppressorstämme handeln. Möglicherweise könnte für TGA bzw. UGA auch eine seltene Aminosäure eingebaut werden. Vor kurzem wurde in *E. coli* eine tRNA Spezies aufgefunden, die ein zu UGA komplementäres Anticodon besitzt. Diese bewirkt an der Stelle des UGA - (Stop)-Codons den Einbau der Aminosäure Selenocystein in Proteine wie Formiat-Dehydrogenase und Glutathion-Peroxidase (Leinfelder et al., 1988).

5.4 Homologie des Plasmids pBE-2 zum Genom von BE-1 und zu anderen Plasmiden

Mehrfach wurde gezeigt, daß der Stamm *M. clara* BE-1 ausgedehnte Homologien zum Plasmid pBE-3 (16 kb) enthält (Marquardt, 1983; Metzler, 1984), jedoch konnten die im Southern Blot auftretenden Banden nur teilweise zugeordnet werden. In dieser Arbeit wurde die Analyse auf das Stammpiasmid pBE-2 ausgedehnt. Durch Vergleich von pBE-2 mit den Cosmidklonen pTM1/56 und pTM5/87, welche den zu BE-1 homologen Bereich enthalten, konnte der integrierte Plasmidanteil näher charakterisiert und der Restriktionskarte von pBE-2 zugeordnet werden.

Daneben wurden zu pBE-2 verwandte Plasmide gefunden und die homologen Bereiche eingegrenzt. Auf die sich daraus eventuell ergebenden Funktionen der Plasmide aus *M. clara* wurde bereits im Ergebnisteil näher eingegangen.

Da seit längerer Zeit bekannt ist, daß an der Bildung von Deletionsmutanten und der Plasmidintegration ins Genom in vielen Fällen IS-Elemente oder Transposons beteiligt sind (Timmis et al., 1978), wurden bereits von Marquardt an denjenigen Stellen des pBE-2 Plasmids IS-Elemente postuliert, an welchen Deletionen auftreten, die zu den verkürzten Plasmiden pBE-3, pBE-2D und pBE-3D führten. Häufig ist an *recA* unabhängigen Plasmid-Rekombinationsprozessen (Yamamoto et al., 1984) der von der Bakterienzelle kodierte "Integration host Factor" (IHF) beteiligt (Prentki et al., 1987), welcher interessanterweise auch verschiedene Promotoren regulieren kann (Thompson & Mosig, 1988).

Die hier durchgeführte Charakterisierung des ins Genom von BE-1 integrierten Plasmidanteils lieferte weitere Indizien für das Auftreten von Plasmidelementen, welche zu Rekombinationsereignissen führen können. Etwa die Hälfte des Plasmids pBE-2 ist im Genom von BE-1 vorhanden. Der Integrationsvorgang führte jedoch an mindestens zwei Orten des integrierten Plasmidanteils zu strukturellen Veränderungen. Möglicherweise wurden zelluläre Sequenzen zwischen die Plasmidbereiche eingeschoben. So wurden die Bereiche E12/E9 sowie A3/(E6) unter "Umlagerung" integriert, wobei interessanterweise Fragment E9 (E3 von pBE-3) einen Bereich darstellt, der sowohl hochtranskribiert wird, als auch als bevorzugter Ausgangspunkt für die Bildung von Plasmid-Deletionsmutanten wie pBE-3D und pBE-2D dient. Da

dieser Bereich auch im Genom von BE-1 umgelagert vorhanden ist, scheinen sich hier zur Rekombination geeignete Elemente zu befinden.

Die DNA Sequenz des Fragments E3 besitzt zwar eine Reihe kürzerer invertierter Repetitionen, jedoch keine ausgedehnten IS-Elemente. Auch wurden durch Computeranalyse keine Homologien zu bekannten Proteinen gefunden, welche Transposition oder Rekombination steuern. Einige dieser Proteine sind meist plasmid- oder phagenkodiert wie beispielsweise Transposase (Kleckner, 1981), Resolvase (Grindey & Reed, 1985; Falvey et al., 1988), Invertase Gin (Mertens et al., 1988), und die in letzter Zeit eingehend untersuchte Familie der Integrasen (Mahillon & Lereclus, 1988).

Da jedoch einerseits auch IS-Elemente mit relativ kurzen invertierten Repetitionen bekannt sind (Ida & Hiestand-Nauer, 1986), und andererseits Transposase auch in trans zur Verfügung gestellt werden kann (Gill et al., 1979), besteht durchaus die Möglichkeit, daß auf dem Plasmid pBE-2 ein *tnpA*- (Transposase) Gen vorhanden ist und auf entferntere IS-Elemente wirkt. Die im Genom integrierten Abschnitte haben aber offensichtlich die Fähigkeit zur Transposition verloren, da die Sequenzen sehr stabil erscheinen und bei verschiedenen Isolierungen keine erkennbaren Veränderungen auftraten.

Da auch das zu Fragment E9 (pBE-2) bzw. E3 (pBE-3) homologe, unter Umlagerung integrierte Fragment (E3i) kloniert wurde, besteht nun die Möglichkeit, durch DNA-Sequenzierung und Vergleich mit Fragment E3 des freien Plasmids mögliche Target-Sequenzen für einen Rekombinationsprozeß zu ermitteln. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch die gefundene Homologie zu einem Bereich des Plasmids R751 (Pansegrau & Lanka, 1987), welcher das Transposon Tn402 (Shapiro & Sporn, 1977) enthält. Aus den Hybridisierungsexperimenten geht hervor, daß die Homologie zu diesem Transposon unter anderem im Bereich des Fragments E5a von pBE-2 liegt. Dieses Fragment stellt das Randfragment des ins Genom von BE-1 integrierten Teils von pBE-2 darstellt. Möglicherweise war ein diesem Transposon verwandtes Element auf dem Plasmid pBE-2 am Integrationsvorgang beteiligt. Nähere Kartierung und DNA-Sequenzierung des Fragments E5a von pBE-2 und Vergleich mit dem homologen, im Genom von BE-1 integrierten Abschnitt könnten nun Aufschluß über den stattgefundenen Rekombinationsprozeß geben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden kryptische Plasmide aus dem obligat methylotrophen Stamm *Methylomonas clara* hinsichtlich Transkription, Integration ins Genom und Verwandtschaft zu anderen Plasmiden untersucht.

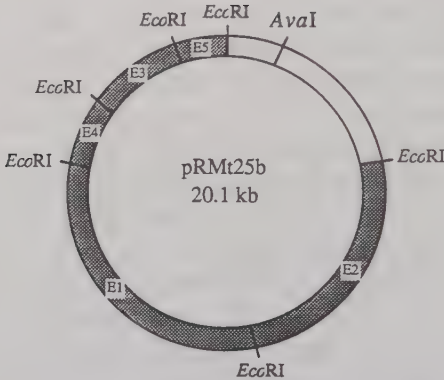
Durch RNA-Hybridisierungen wurde die Verteilung der Transkriptionsaktivität auf den Plasmiden pBE-2 (46 kb) und pBE-3 (16 kb) in *M. clara* bestimmt. Die Analyse, welche unter Verwendung eines ColE1-origins auch in *E. coli* durchgeführt wurde, ergab, daß auf beiden Plasmiden sowohl in *M. clara* als auch in *E. coli* ein ca. 2 kb großer Bereich um etwa eine Größenordnung stärker transkribiert wird als der übrige Teil der Plasmide. Dieser Abschnitt wurde vollständig sequenziert (2065 bp) und näher analysiert. Insgesamt konnten auf diesem Plasmidbereich sechs Promotoren gefunden werden, welche sämtliche hochkonservierten Nukleotide der bakteriellen Consensus-Sequenz enthalten. Diese Promotoren sind hierbei in zwei Regionen im Abstand von 1400 Basen angeordnet, wobei in jeder Region je drei der oben genannten Promotoren gegenseitig divergierend überlappen und offensichtlich gemeinsam reguliert werden. Während einer dieser Promotoren (pL) unter "normalen" Bedingungen extrem aktiv ist, scheinen die übrigen abgeschaltet oder wenig aktiv zu sein. Durch nähere RNA-Kartierung sowie S1 und "Primer-Extension" Analyse konnte der für die hohe Transkription verantwortliche Promotor (pL) identifiziert und der Startpunkt der Transkription bestimmt werden. Unter Verwendung des aktiven Promotors (pL) wurden Expressionsvektoren für β -Galaktosidase und Interleukin 2 konstruiert und die Grundlagen für ein Expressionssystem in *M. clara* geschaffen.

Durch Analyse von Cosmidklonen wurde ein im Genom des plasmidfreien Stammes *M. clara* BE-1 integrierter, plasmidhomologer Abschnitt charakterisiert. Hybridisierungsexperimente ergaben, daß etwa die Hälfte des Plasmids pBE-2 (46 kb) im Genom dieses Stammes enthalten ist. Die Integration verlief an mindestens zwei Orten unter struktureller Veränderung bestimmter Plasmidbereiche. Diese konnten der Restriktionskarte von pBE-2 zugeordnet, subkloniert und näher charakterisiert werden.

Weiterhin wurde eine signifikante Homologie der - hinsichtlich biologischer Funktion kryptischen - Plasmide aus *M. clara* zu den Plasmiden R538, R751, TP114drp1, N3, R387, R906 und R55 gefunden. Diese Homologie wurde am Beispiel von R751 genauer untersucht und kartiert. Sie umfaßt einen Bereich von etwa 8 kb, in welchem auf R751 das Transposon Tn 402 liegt.

7. ANHANG

7.1 Plasmid pRMt25b



Plasmid pRMt25b mit *EcoRI*-Schnittstellen; (Marquardt, 1983);
gepunktet: pBE-3 Anteile;
offen: pBR322

7.2 Sequenz des IL-2 Expressionsvektors pTM-IL-2

Die Sequenz ist von der *EcoRI* bis zur *HindIII*-Schnittstelle des pUC-Vektors dargestellt und enthält somit auch die durch Fusion der pUC 12 und pUC 18 Vektoren entstandenen Polylinkeranteile;

	10	20	30	40	50
GAATTCGAGC	TCGGTACCCG	GGGATCCTCT	AGAGTCGAAG	CCGGCAGGCC	
E T SA	KR SN	BB M X	H T	N H	
C A AL	PS MC	AI N B	I A	A P	
O Q CU	NA AI	MN L A	N Q	E A	
1 1 11	11 11	11 1 1	1 1	1 2	
	60	70	80	90	100
GAAGACAGGC	GCGGCCGCGG	CCGACATCCG	GCGGCCTTC	GCCTGTTGCG	
M HF NXHF F	F HXH NH H				
B HN OMAN N	O PMA AP A				
O AU TAEU U	K AAE EA E				
2 12 1331 1	1 233 12 3				
	110	120	130	140	150
TTTGTGTTG	TTTACTGTAA	AATACAACAT	ACAACAACAA	ACAACACAAC	

160	170	180	190	200
CAACCGGAAG	GAGTAATTCA	TGGCGCGGAC	CTCTTCTTCT	ACCAAAAAGA
H	N	NH	M M M	H
P	L	AH	N B B	I
A	A	RA	L O O	N
2	3	11	1 2 2	1

210	220	230	240	250
CTCAACTGCA	ACTGGAACAC	CTGCTGTCTGG	ACCTGCAGAT	GATCCTGAAC
	B	B T	A B P	H
	S	B T	V S S	I
	P	V H	A P T	N
	1	1 2	2 1 1	1

260	270	280	290	300
GGTATCAACA	ACTACAAAAA	CCCGAAACTG	ACGCGTATGC	TGACCTTCAA
		H MF		
		G LN		
		A UU		
		1 12		

310	320	330	340	350
ATTCTACATG	CCGAAAAAAG	CTACCGAACT	GAAACACCTC	CAGTGTCTAG
NN	A		M	X M
SL	L		N	B B
PA	U		L	A O
13	1		1	1 2

360	370	380	390	400
AAGAAGAGCT	GAAACCGCTG	GAGGAAGTTC	TGAACCTGGC	TCAGTCTAAA
M A	N	M	B D	
B L	S	N	S D	
O U	P	L	T E	
2 1	2	1	1 1	

410	420	430	440	450
AATTTCCACC	TGCGTCCGCG	TGACCTGATC	TCTAACATCA	ACGTTATCGT
B H	F	S		
S G	N	A		
P A	U	U		
1 1	2	A		

460	470	480	490	500
TCTGGAGCTC	AAAGGTTCTG	AAACCACGTT	CATGTGCGAA	TACGCGGACG
SA			N	F
AL			L	N
CU			A	U
11			3	2

510	520	530	540	550
AAACTGCGAC	GATCGTTGAA	TTTCTGAACC	GTTGGATCAC	CTTCTGCCAG
P S			BS H	
V A			IA P	
U U			NU H	
1 A			IA 1	

560	570	580	590
TCGATCATCT	CTACCCTGAC	CTGATAAGTC	GACGTCCCGC
T S		ST A	HA
A A		AA A	IL
Q U		LQ T	NU
1 A		11 2	31

```

      460          470          480          490          500
TCTGGAGCTC AAAGGTTCTG AAACCACGTT CATGTGCGAA TACGCGGACG
  SA              N              F
  AL              L              N
  CU              A              U
  ll              3              2

      510          520          530          540          550
AAACTGCGAC GATCGTTGAA TTTCTGAACC GTTGGATCAC CTTCTGCCAG
  P S              BS H
  V A              IA P
  U U              NU H
  l A              1A 1

      560          570          580          590
TCGATCATCT CTACCCCTGAC CTGATAAGTC GACGTCCCGC CCAAGCTT
T S              ST A              HA
A A              AA A              IL
Q U              LQ T              NU
l A              ll 2              31

```

7.3 Schnittstellen für Restriktionsenzyme auf Fragment E3 (pBE-3)

Dargestellt sind die durch Computeranalyse ermittelten Restriktionsenzym-Schnittstellen des hochtranskribierten Fragments E3 aus dem *M. clara* Plasmid pBE-3;

	#	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS	
AFL 3 (ACPQGT)	1	1944	1944 (94.1)	1	1944
			121 (5.9)	1944	2065
ALU 1 (AGCT)	12	167	482 (23.3)	1504	1986
		528	361 (17.5)	167	528
		620	175 (8.5)	1176	1351
		715	171 (8.3)	1005	1176
		831	167 (8.1)	1	167
		972	153 (7.4)	1351	1504
		1005	141 (6.8)	831	972
		1176	116 (5.6)	715	831
		1351	95 (4.6)	620	715
		1504	92 (4.5)	528	620
		1986	71 (3.4)	1994	2065
		1994	33 (1.6)	972	1005
			8 (0.4)	1986	1994

ASU 2 (TTTCGAA)	1	4	2061 (99.8)	4	2065
			4 (0.2)	1	4
AVA 1 (CQCQPG)	1	82	1983 (96.0)	82	2065
			82 (4.0)	1	82
BAL 1 (TGGCCA)	6	40	698 (33.8)	1171	1869
		142	540 (26.2)	551	1091
		551	409 (19.8)	142	551
		1091	196 (9.5)	1869	2065
		1171	102 (4.9)	40	142
		1869	80 (3.9)	1091	1171
			40 (1.9)	1	40
BAN 1 (GGQPCC)	2	1928	1928 (93.4)	1	1928
		2045	117 (5.7)	1928	2045
			20 (1.0)	2045	2065
BBV 1 (GCTGC)	14	487	487 (23.6)	1	487
		529	420 (20.3)	1575	1995
		574	295 (14.3)	574	869
		369	220 (10.7)	1355	1575
		346	108 (5.2)	1244	1352
		951	89 (4.3)	988	1077
		988	86 (4.2)	1077	1163
		077	81 (3.9)	1163	1244
		163	77 (3.7)	869	946
		244	70 (3.4)	1995	2065
		352	45 (2.2)	529	574
		355	42 (2.0)	487	529
		1575	37 (1.8)	951	988
		1995	5 (0.2)	946	951
			3 (0.1)	1352	1355
BGL 1 (GCCNNNNNGGC)	8	135	805 (39.0)	1260	2065
		466	433 (21.0)	827	1260
		490	331 (16.0)	135	466
		516	167 (8.1)	565	732
		565	135 (6.5)	1	135
		732	95 (4.6)	732	827
		827	49 (2.4)	516	565

	1260	26 (1.3)	490	516
		24 (1.2)	466	490
BIN 1 (GGATC)	5			
	35	825 (40.0)	374	1199
	373	743 (36.0)	1322	2065
	374	338 (16.4)	35	373
	1199	123 (6.0)	1199	1322
	1322	35 (1.7)	1	35
		1 (0.0)	373	374
BSM 1 (GAATGC)	2			
	1394	1394 (67.5)	1	1394
	1457	608 (29.4)	1457	2065
		63 (3.1)	1394	1457
BSP 1286 (G2GC3C)	3			
	422	1186 (57.4)	879	2065
	851	429 (20.8)	422	851
	879	422 (20.4)	1	422
		28 (1.4)	851	879
BSS H2 (GCGCGC)	5			
	462	462 (22.4)	1	462
	728	414 (20.0)	1651	2065
	1016	349 (16.9)	1302	1651
	1302	288 (13.9)	728	1016
	1651	286 (13.8)	1016	1302
		266 (12.9)	462	728
BST N1 (CCRGG)	5			
	38	1041 (50.4)	467	1508
	65	402 (19.5)	65	467
	467	359 (17.4)	1508	1867
	1508	198 (9.6)	1867	2065
	1867	38 (1.8)	1	38
		27 (1.3)	38	65
CFR 1 (QGGCCP)	21			
	40	287 (13.9)	1582	1869
	130	228 (11.0)	1282	1510
	142	212 (10.3)	825	1037
	197	211 (10.2)	614	825
	214	196 (9.5)	1869	2065
	364	150 (7.3)	214	364
	497	133 (6.4)	364	497
	551	111 (5.4)	1171	1282
	614	90 (4.4)	40	130
	825	80 (3.9)	1091	1171
	1037	63 (3.1)	551	614
	1050	55 (2.7)	142	197
	1091	54 (2.6)	497	551
	1171	41 (2.0)	1050	1091
	1282	40 (1.9)	1	40
	1510	26 (1.3)	1510	1536

		1536	23 (1.1)	1544	1567
		1544	17 (0.8)	197	214
		1567	15 (0.7)	1567	1582
		1582	13 (0.6)	1037	1050
		1869	12 (0.6)	130	142
			8 (0.4)	1536	1544
DDE 1 (CTNAG)	1				
		1816	1816 (87.9)	1	1816
			249 (12.1)	1816	2065
EAE 1 (QGGCCP)	21				
		40	287 (13.9)	1582	1869
		130	228 (11.0)	1282	1510
		142	212 (10.3)	825	1037
		197	211 (10.2)	614	825
		214	196 (9.5)	1869	2065
		364	150 (7.3)	214	364
		497	133 (6.4)	364	497
		551	111 (5.4)	1171	1282
		614	90 (4.4)	40	130
		825	80 (3.9)	1091	1171
		1037	63 (3.1)	551	614
		1050	55 (2.7)	142	197
		1091	54 (2.6)	497	551
		1171	41 (2.0)	1050	1091
		1282	40 (1.9)	1	40
		1510	26 (1.3)	1510	1536
		1536	23 (1.1)	1544	1567
		1544	17 (0.8)	197	214
		1567	15 (0.7)	1567	1582
		1582	13 (0.6)	1037	1050
		1869	12 (0.6)	130	142
			8 (0.4)	1536	1544
ECO R1 (GAATTC)	2				
		1	2059 (99.7)	1	2060
		2060	5 (0.2)	2060	2065
			1 (0.0)	1	1
FNU 4H1 (GCNGC)	42				
		132	237 (11.5)	1575	1812
		196	188 (9.1)	1355	1543
		199	161 (7.8)	1812	1973
		202	146 (7.1)	202	348
		348	132 (6.4)	1	132
		363	86 (4.2)	1077	1163
		433	84 (4.1)	1244	1328
		479	81 (3.9)	1163	1244
		487	77 (3.7)	869	946
		516	77 (3.7)	613	690
		529	70 (3.4)	363	433
		574	69 (3.3)	690	759
		592	65 (3.1)	759	824
		595	64 (3.1)	2001	2065
		613	64 (3.1)	132	196
		690	46 (2.2)	433	479

759	45	2.2)	529	574
824	40	1.9)	988	1028
836	38	1.8)	1039	1077
839	37	1.8)	951	988
869	30	1.5)	839	869
946	29	1.4)	487	516
951	24	1.2)	1328	1352
988	22	1.1)	1973	1995
1028	19	0.9)	1556	1575
1036	18	0.9)	595	613
1039	18	0.9)	574	592
1077	15	0.7)	348	363
1163	13	0.6)	516	529
1244	12	0.6)	824	836
1328	10	0.5)	1546	1556
1352	8	0.4)	1028	1036
1355	8	0.4)	479	487
1543	5	0.2)	946	951
1546	3	0.1)	1998	2001
1556	3	0.1)	1995	1998
1575	3	0.1)	1543	1546
1812	3	0.1)	1352	1355
1973	3	0.1)	1036	1039
1995	3	0.1)	836	839
1998	3	0.1)	592	595
2001	3	0.1)	199	202
	3	0.1)	196	199

FNU D2 (CGCG)

26

92	411	(19.9)	1654	2065
195	213	(10.3)	804	1017
399	204	(9.9)	195	399
463	133	(6.4)	1415	1548
510	103	(5.0)	92	195
518	102	(4.9)	1548	1650
608	100	(4.8)	1203	1303
671	92	(4.5)	1	92
729	90	(4.4)	518	608
774	83	(4.0)	1074	1157
791	64	(3.1)	399	463
804	63	(3.1)	608	671
1017	58	(2.8)	671	729
1030	50	(2.4)	1365	1415
1074	47	(2.3)	463	510
1157	45	(2.2)	729	774
1181	44	(2.1)	1030	1074
1203	35	(1.7)	1330	1365
1303	27	(1.3)	1303	1330
1330	24	(1.2)	1157	1181
1365	22	(1.1)	1181	1203
1415	17	(0.8)	774	791
1548	13	(0.6)	1017	1030
1650	13	(0.6)	791	804
1652	8	(0.4)	510	518
1654	2	(0.1)	1652	1654
	2	(0.1)	1650	1652

FOX 1 (GGATG)

4

210	729	(35.3)	1336	2065
677	467	(22.6)	210	677
1110	433	(21.0)	677	1110
1336	226	(10.9)	1110	1336
	210	(10.2)	1	210

GDI 2 (QGGCCG)

15

130	483 (23.4)	1582	2065
197	232 (11.2)	1050	1282
214	228 (11.0)	1282	1510
364	212 (10.3)	825	1037
497	211 (10.2)	614	825
614	150 (7.3)	214	364
825	133 (6.4)	364	497
1037	130 (6.3)	1	130
1050	117 (5.7)	497	614
1282	67 (3.2)	130	197
1510	26 (1.3)	1510	1536
1536	23 (1.1)	1544	1567
1544	17 (0.8)	197	214
1567	15 (0.7)	1567	1582
1582	13 (0.6)	1037	1050
	8 (0.4)	1536	1544

HAE 1 (RGGCCR)

7

40	540 (26.2)	551	1091
142	409 (19.8)	142	551
551	373 (18.1)	1496	1869
1091	325 (15.7)	1171	1496
1171	196 (9.5)	1869	2065
1496	102 (4.9)	40	142
1869	80 (3.9)	1091	1171
	40 (1.9)	1	40

HAE 2 (PGCGCQ)

6

219	994 (48.1)	219	1213
1213	386 (18.7)	1589	1975
1440	227 (11.0)	1213	1440
1589	219 (10.6)	1	219
1975	149 (7.2)	1440	1589
2031	56 (2.7)	1975	2031
	34 (1.6)	2031	2065

HAE 3 (GGCC)

37

41	265 (12.8)	1605	1870
63	195 (9.4)	1870	2065
86	174 (8.4)	826	1000
131	150 (7.3)	215	365
143	126 (6.1)	1283	1409
198	87 (4.2)	1172	1259
215	87 (4.2)	365	452
365	80 (3.9)	1092	1172
452	56 (2.7)	633	689
498	55 (2.7)	143	198
552	54 (2.6)	498	552
564	51 (2.5)	689	740
615	51 (2.5)	564	615
633	46 (2.2)	452	498
689	45 (2.2)	781	826
740	45 (2.2)	86	131
781	41 (2.0)	1051	1092
826	41 (2.0)	740	781
1000	41 (2.0)	1	41
1027	40 (1.9)	1446	1486
1038	37 (1.8)	1409	1446
1051	27 (1.3)	1000	1027
1092	26 (1.3)	1511	1537
1172	24 (1.2)	1259	1283

		1259	23 (1.1)	1545	1568
		1283	23 (1.1)	63	86
		1409	22 (1.1)	1583	1605
		1446	22 (1.1)	41	63
		1486	18 (0.9)	615	633
		1497	17 (0.8)	198	215
		1511	15 (0.7)	1568	1583
		1537	14 (0.7)	1497	1511
		1545	13 (0.6)	1038	1051
		1568	12 (0.6)	552	564
		1583	12 (0.6)	131	143
		1605	11 (0.5)	1486	1497
		1870	11 (0.5)	1027	1038
			.8 (0.4)	1537	1545
HGI A1 (GRGCRC)	2	422	1214 (58.8)	851	2065
		851	429 (20.8)	422	851
			422 (20.4)	1	422
HGI C1 (GGQPC)	2	1928	1928 (93.4)	1	1928
		2045	117 (5.7)	1928	2045
			20 (1.0)	2045	2065
HHA 1 (GCGC)	37	93	269 (13.0)	1707	1976
		194	178 (8.6)	220	398
		220	146 (7.1)	803	949
		398	132 (6.4)	1441	1573
		462	124 (6.0)	1080	1204
		464	101 (4.9)	93	194
		519	93 (4.5)	1	93
		607	88 (4.3)	1214	1302
		670	88 (4.3)	519	607
		728	64 (3.1)	398	462
		730	63 (3.1)	607	670
		773	61 (3.0)	1590	1651
		803	58 (2.8)	670	728
		949	57 (2.8)	1018	1075
		991	56 (2.7)	1976	2032
		1016	55 (2.7)	464	519
		1018	43 (2.1)	730	773
		1075	42 (2.0)	1665	1707
		1080	42 (2.0)	949	991
		1204	33 (1.6)	2032	2065
		1214	33 (1.6)	1331	1364
		1302	31 (1.5)	1385	1416
		1304	30 (1.5)	773	803
		1331	27 (1.3)	1304	1331
		1364	26 (1.3)	194	220
		1379	25 (1.2)	1416	1441
		1385	25 (1.2)	991	1016
		1416	17 (0.8)	1573	1590
		1441	15 (0.7)	1364	1379
		1573	12 (0.6)	1653	1665
		1590	10 (0.5)	1204	1214
		1651	6 (0.3)	1379	1385
		1653	5 (0.2)	1075	1080
		1665	2 (0.1)	1651	1653
		1707	2 (0.1)	1302	1304
		1976	2 (0.1)	1016	1018

	2032	2 (0.1)	728	730
		2 (0.1)	462	464
HINF 1 (GATC)				
	4			
	99	1320 (63.9)	745	2065
	297	252 (12.2)	493	745
	493	198 (9.6)	99	297
	745	196 (9.5)	297	493
		99 (4.8)	1	99
HPA 2 (CCGG)				
	22			
	61	355 (17.2)	698	1053
	176	258 (12.5)	1668	1926
	213	176 (8.5)	522	698
	217	165 (8.0)	290	455
	290	139 (6.7)	1926	2065
	455	126 (6.1)	1444	1570
	505	115 (5.6)	61	176
	522	110 (5.3)	1334	1444
	698	98 (4.7)	1113	1211
	1053	73 (3.5)	217	290
	1113	65 (3.1)	1603	1668
	1211	61 (3.0)	1	61
	1249	60 (2.9)	1053	1113
	1285	50 (2.4)	455	505
	1308	38 (1.8)	1211	1249
	1334	37 (1.8)	176	213
	1444	36 (1.7)	1249	1285
	1570	26 (1.3)	1308	1334
	1585	23 (1.1)	1285	1308
	1603	18 (0.9)	1585	1603
	1668	17 (0.8)	505	522
	1926	15 (0.7)	1570	1585
		4 (0.2)	213	217
HPH 1 (GGTGA)				
	8			
	794	794 (38.5)	1	794
	919	520 (25.2)	1121	1641
	1056	156 (7.6)	1909	2065
	1121	145 (7.0)	1641	1786
	1641	137 (6.6)	919	1056
	1786	125 (6.1)	794	919
	1792	117 (5.7)	1792	1909
	1909	65 (3.1)	1056	1121
		6 (0.3)	1786	1792
MBO 2 (GAAGA)				
	3			
	186	1639 (79.4)	186	1825
	1825	186 (9.0)	1	186
	1940	125 (6.1)	1940	2065
		115 (5.6)	1825	1940
MNL 1 (CCTC)				
	19			
	124	289 (14.0)	1776	2065
	138	235 (11.4)	369	604
	369	231 (11.2)	138	369

		604	239 (10.1)	687	896
		640	195 (9.4)	1412	1607
		687	154 (7.9)	1102	1266
		896	154 (7.5)	1613	1767
		959	146 (7.1)	1266	1412
		977	124 (6.0)	1	124
		998	77 (3.7)	1025	1102
		1013	63 (3.1)	896	959
		1025	47 (2.3)	640	687
		1102	36 (1.7)	604	640
		1266	21 (1.0)	977	998
		1412	18 (0.9)	959	977
		1607	15 (0.7)	998	1013
		1613	14 (0.7)	124	138
		1767	12 (0.6)	1013	1025
		1776	9 (0.4)	1767	1776
			6 (0.3)	1607	1613
MST 1 (TGCGCA)					
	2				
		1079	1079 (52.3)	1	1079
		1706	627 (30.4)	1079	1706
			359 (17.4)	1706	2065
NAE 1 (GCCGGC)					
	9				
		175	763 (36.9)	521	1284
		216	305 (14.8)	216	521
		521	258 (12.5)	1667	1925
		1284	175 (8.5)	1	175
		1443	159 (7.7)	1284	1443
		1569	140 (6.8)	1925	2065
		1602	126 (6.1)	1443	1569
		1667	65 (3.1)	1602	1667
		1925	41 (2.0)	175	216
			33 (1.6)	1569	1602
NCI 1 (CCSGG)					
	7				
		60	599 (29.0)	454	1053
		454	480 (23.2)	1585	2065
		1053	394 (19.1)	60	454
		1113	278 (13.5)	1307	1585
		1248	135 (6.5)	1113	1248
		1307	60 (2.9)	1053	1113
		1585	60 (2.9)	1	60
			59 (2.9)	1248	1307
NLA 3 (CATG)					
	10				
		21	372 (18.0)	1483	1855
		305	341 (16.5)	305	646
		646	284 (13.8)	21	305
		887	241 (11.7)	646	887
		994	210 (10.2)	1855	2065
		1187	193 (9.3)	994	1187
		1263	113 (5.5)	1263	1376
		1376	107 (5.2)	1376	1483
		1483	107 (5.2)	887	994
		1855	76 (3.7)	1187	1263
			21 (1.0)	1	21

NLA 4 (GGNNCC)

6				
	68	779 (37.7)	373	1152
	373	528 (25.6)	1400	1928
	1152	305 (14.8)	68	373
	1400	248 (12.0)	1152	1400
	1928	117 (5.7)	1928	2045
	2045	68 (3.3)	1	68
		20 (1.0)	2045	2065

NOT 1 (GCGGCCGC)

3				
	196	840 (40.7)	196	1036
	1036	522 (25.3)	1543	2065
	1543	507 (24.6)	1036	1543
		196 (9.5)	1	196

NRU 1 (TCGCGA)

1				
	509	1556 (75.4)	509	2065
		509 (24.6)	1	509

NSP B2 (CVGCWG)

1				
	1462	1462 (70.8)	1	1462
		603 (29.2)	1462	2065

RSA 1 (GTAC)

1				
	1229	1229 (59.5)	1	1229
		836 (40.5)	1229	2065

SAU 3A (GATC)

9				
	35	604 (29.2)	544	1148
	320	590 (28.6)	1322	1912
	338	285 (13.8)	35	320
	374	170 (8.2)	374	544
	544	153 (7.4)	1912	2065
	1148	123 (6.0)	1199	1322
	1199	51 (2.5)	1148	1199
	1322	36 (1.7)	338	374
	1912	35 (1.7)	1	35
		18 (0.9)	320	338

SAU 96 (GGNCC)

8				
	85	579 (28.0)	1486	2065
	452	478 (23.1)	781	1259
	632	367 (17.8)	85	452
	740	180 (8.7)	452	632
	781	150 (7.3)	1259	1409
	1259	108 (5.2)	632	740
	1409	85 (4.1)	1	85
	1486	77 (3.7)	1409	1486
		41 (2.0)	740	781

SCR F1 (CCNGG)

12				
	38	586 (28.4)	467	1053
	60	389 (18.8)	65	454
	65	282 (13.7)	1585	1867
	454	201 (9.7)	1307	1508
	467	198 (9.6)	1867	2065
	1053	135 (6.5)	1113	1248

1113	77	(3.7)	1508	1585
1248	60	(2.9)	1053	1113
1307	59	(2.9)	1248	1307
1508	38	(1.8)	1	38
1585	22	(1.1)	38	60
1867	13	(0.6)	454	467
	5	(0.2)	60	65

SDU 1 (G2GC3C)

3

422	1186	(57.4)	879	2065
851	429	(20.8)	422	851
879	422	(20.4)	1	422
	28	(1.4)	851	879

TAQ 1 (TCGA)

5

5	300	(43.6)	170	1070
29	699	33.8	1320	2019
170	350	(12.1)	1070	1320
1070	142	(6.9)	28	170
1320	46	(2.2)	2019	2065
2019	23	(1.1)	5	28
	5	(0.2)	1	5

TTH111 2 (CCAPCA)

9

13	393	(19.0)	13	406
406	347	(16.8)	1525	1872
752	346	(16.8)	406	752
883	267	(12.9)	922	1189
922	193	(9.3)	1872	2065
1189	168	(8.1)	1357	1525
1357	168	(8.1)	1189	1357
1525	131	(6.3)	752	883
1872	39	(1.9)	883	922
	13	(0.6)	1	13

XHO 2 (PGATCQ)

1

373	1692	(81.9)	373	2065
	373	(18.1)	1	373

XMA 3 (CGGCCG)

9

130	521	(25.2)	1544	2065
197	507	(24.6)	1037	1544
214	212	(10.3)	825	1037
364	211	(10.2)	614	825
497	150	(7.3)	214	364
614	133	(6.4)	364	497
825	130	(6.3)	1	130
1037	117	(5.7)	497	614
1544	67	(3.2)	130	197
	17	(0.8)	197	214

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Adhya, S. & Miller, W. (1979). Modulation of the two promoters of the galactose operon of *Escherichia coli*.
Nature 279, 492-494.
- Akiba, T., Koyame, K., Ishihi, Y., and Kumira, S. (1960). On the mechanism of the development of multiple drug-resistance clones of *Shigella*.
Japan J. Microbiol. 4, 219.
- Allen L.N. & Hanson, R.S. (1985). Construction of Broad-Host-Range Cosmid Cloning Vectors: Identification of Genes Necessary for Growth of *Methylobacterium organophilum* on Methanol.
J. Bacteriol. 161, 955-962.
- Alt-Moerbe J., Rak, B. & Schröder, J. (1986). A 3.6-kbp segment from the *vir* region of Ti plasmids contains genes responsible for border sequence-directed production of T region circles in *E. coli*.
EMBO J. 5, 1129-1135.
- Alton, N.K. & Vapnek, D. (1978). Molecular Cloning of Restriction Fragments and Construction of a Physical and Genetic Map of *Escherichia coli* Plasmid R538-1. *Plasmid* 1, 388-404.
- Alton, N.K. & Vapnek, D. (1979). Transcription and Translation of R-plasmid 538-1 DNA: Effects of Mercury Induction and Analysis of Polypeptides Coded for by the r-Determinant Region.
Plasmid, 2, 366-376.
- Alvarez-Morales, A., Betancourt-Alvarez, M., Kaluza, K. & Hennecke, H. (1986). Activation of the *Bradyrhizobium japonicum* *nifH* and *nifDK* operons is dependent on promoter-upstream DNA sequences.
Nucl. Acids Res. 14, 4207-4227.
- Amann, E., Brosius, J., and Ptashne, M. (1983). Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *E. coli*.
Gene 25, 167-178.
- Ando, T. & Arai, T. (1981) Genetic Structure of the IncN Plasmid N3.
Plasmid 6, 293-301.
- Arber, W. & Linn, S. (1960). DNA modification and restriction.
Ann. Rev. Biochem. 38, 467-500.

- Ausubel, F.M., Friedmann, A.M., Long, S.R., Brown, S.E., Buikema W.J. (1982). Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18, 289-296.
- Barbour, A.G. & Garon, C.F. (1987). Linear Plasmids of the Bacterium *Borrelia burgdorferi* Have Covalently Closed Ends. *Science* 237, 409-411.
- Bassford, P., Beckwith, J., Berman, M., Brinkmann, E., Casadaban, M., Guarente, L., Saint-Girons, I., Sarthy, A., Schwartz, M., Shuman, H. & Silhavy, T. (1978). Genetic fusions of the lac operon: a new approach to the study of biological processes, 245-261. In: J. Miller and W. Reznikoff (ed), The operon. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- Baty, D., Lloubès, R., Geli, V., Lazdunski, C. & Howard, P. S. (1987). Extracellular release of colicin A is non-specific. *EMBO J.* 6, 2463-2468.
- Bennett, G.N. & Yanofsky, C. (1978). Sequence Analysis of Operator Constitutive Mutants of the Tryptophan Operon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 121, 179-192.
- Berk, A.J. & Sharp, P.A. (1977). Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease digested hybrids. *Cell* 12, 721-732.
- Besse, M., von Wilcken-Bergmann & Müller-Hill, B. (1986). Synthetic lac operator mediates repression through lac repressor when introduced upstream and downstream from lac promoter. *EMBO J.* 5, 1377-1381.
- Bingham, A.H.A., Ponnambalam, S., Chan, B. & Busby, S. (1986). Mutations that reduce expression from P2 promoter of *Escherichia coli* galactose operon. *Gene* 41, 67-74.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bradley, D.E. (1979). Morphology of Pili Determined by the N Incompatibility Group Plasmid N3 and Interaction with Bacteriophages PR4 and IKE. *Plasmid* 2, 632-636.
- Brawermann, G. (1987). Determinants of RNA Stability. *Cell* 48, 5.

- Bremer, E., Gerlach, P. & Middendorf, A. (1988). Double Negative and Positive Control of *tsx* Expression in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 170, 108-116.
- Brendel, V. & Trifonov, E.N. (1984). A computer algorithm for testing potential prokaryotic terminators.
Nucl. Acids Res. 12, 4411-4427.
- Brosius, J. (1984). Plasmid vectors for the selection of promoters.
Gene 27, 151-160.
- Büchel, D.E., Gronenborn, B. & Müller-Hill, B. (1980). Sequence of the lactose permease gene.
Nature, 283, 541-545.
- Bujard, H. (1980). The interaction of *E. coli* RNA polymerase with promoters.
Trends in Biochem. Sciences 5, 274-278.
- Bukhari, A.I., Shapiro, J. A. & Adhya, S. (1977). DNA Insertion Elements, Episomes and Plasmids. Cold Spring Harbor.
- Byrom, D. (1981). Taxonomy of methylotrophs: a reappraisal. In: Dalton, H. (Ed.), Microbial Growth on C1 Compounds. Proceedings of the 3rd International Symposium, Sheffield, Heyden, Chichester; 278-284.
- Caillet, J., Plumbridge, J. & Springer, M. (1985). Evidence that *pheV*, a gene for tRNA^{phe} of *E. coli* is transcribed from tandem promoters.
Nucl. Acids Res. 13, 3699-3710.
- Casadaban, M.J., Chou, J. & Cohen, S.N. (1980). In Vitro Gene Fusions That Join an Enzymatically Active β -Galactosidase Segment to Amino-Terminal Fragments of Exogenous Proteins: *Escherichia coli* plasmid Vectors for the Detection and Cloning of Translational Initiation Signals.
J. Bacteriol., 143, 971-980.
- Casey, J. & Davidson, N. (1977). Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA Duplexes at high concentrations of formamide.
Nucl. Acids Res. 4, 1539.
- Caughey, P.A., de Feyter, R. & Lane H.E.D. (1986). The miniF plasmid C protein: sequence, purification and DNA binding.
Nucl. Acids Res. 14, 9699-9711.
- Cavanaugh, C.M., Levering, P.R., Maki, J.S., Mitchell, R. & Lidstrom, M.E. (1987). Symbiosis of methylotrophic bacteria and deep-sea mussels.
Nature 325, 346-348.
- Cesarini, G. & Banner, D. W. (1985). Regulation of plasmid copy number by complementary RNAs. Trends in Biochem. Sci. 10, 303-306.

- Chen, E.J. & Seeburg, P.H. (1985). Supercoil Sequencing: a fast simple method for sequencing plasmid DNA.
DNA 4, 165-170.
- Chesshyre, J.A., Carr, A.J. & Hipkiss, A.R. (1987). Proteolysis in the obligate methylotroph *Methylophilus methylotrophus*.
Arch. Microbiol. 147, 394-398.
- Clewell, D.B. (1972). Nature of ColE1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of Chloramphenicol.
J. Bacteriol. 110, 667-676.
- Clowes, R.C. (1972). Molecular structure of bacterial plasmids.
Bact. Rev. 36, 361-404.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110-2114.
- Colby, J., Dalton, H. & Whittenbury, R. (1979). Biological and biochemical aspects of microbial growth on C1 compounds.
Ann. Rev. Microbiol. 33, 481-571.
- Cowing, D.W., Bardwell, J.C.A., Craig, E.A., Woolford, C., Hendrix, R.W. & Gross, C.A. (1985). Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2679-2683.
- Dalrymple, B.P. & Williams, P.H. (1984). Analysis of the R16 Plasmid Primase Gene.
Plasmid 12, 206-210.
- Datta, N. (1974). Epidemiology and classification of plasmids, *In: Microbiology*.
- Davey, J.F. Whittenbury, R. & Wilkinson, J.F., (1966). The distribution in the methylotrophic bacteria of some key enzymes concerned with intermediary metabolism.
Arch. Microbiol. 87, 359-364.
- De Maeyer, E., Skup, D., Prasad, K.S.N., De Maeyer-Guignard, J., Williams, B., Meacock, P., Sharpe, G., Pioli, D., Hennam, J., Schluch, W. & Atherton, K. (1982). Expression of a chemically synthesised $\alpha 1$ interferon gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4256-4259.
- De Massy, B & Weisberg, R.A. (1987). Gene 3 Endonuclease of Bacteriophage T7 Resolves Conformationally Branched Structures in Double-stranded DNA.
J. Mol. Biol. 193, 359-376.

- Deretic, V., Gill, J.F. & Chakrabarty, A.M. (1987). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: nucleotide sequence and transcriptional regulation of the *algD* gene.
Nucl. Acids Res. 15, 4567-4581.
- Deuschle, U., Gentz, R. & Bujard, H. lac repressor blocks transcribing RNA polymerase and terminates transcription.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4134-4137.
- Diekmann, S. & Lilley, M.J. (1987). The anomalous gel migration of a stable cruciform: temperature and salt dependence, and some comparisons with curved DNA.
Nucl. Acids Res. 14, 5765-5774.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., Helinski, D.R. (1980). Broad host range cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7347-7351.
- Dunn, T.M., Hahn, S. Ogden, S. & Schleif, R.F. (1984). An operator at -280 base pairs that is required for repression of *araBAD* operon promoter: Addition of DNA helical turns between the operator and promoter cyclically hinders repression.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5017-5020.
- Echols, H. (1986). Multiple DNA-Protein Interactions Governing High-Precision DNA Transactions.
Science 233, 1050-1056.
- Elion, E.A. & Warner, J.R. (1984). The major promoter element of rRNA transcription in yeast lies 2 kb upstream.
Cell 39, 663-673.
- Engels, J., Uhlmann, E., Wengenmayer, F., Müllner, H., Okazaki, H., Mertz, R. & Winnacker, E.-L. (1985). Gentechnologische Verfahren zur Herstellung von Human-Interleukin-2 und Mittel zur Durchführung dieses Verfahrens.
Deutsche Patentanmeldung P 34 19 995.0 (Hoechst AG, 1985).
- Falvey, E. Hatfull, G.F. & Grindley N.D.F. (1988). Uncoupling of the recombination and topoisomerase activities of the $\gamma\delta$ resolvase by mutation of the crossover point.
Nature 332, 861-863.
- Faust, U., Präve, P. & Sukatsch, D.A. (1977). Continuous biomass production from methanol by *Methylobionas clara*. J. Ferment. Technol. 55, 609-614.
- Favaloro, J., Treisman, R. & Kamen, R. (1980). Transcription maps of polyoma virus-specific RNA: Analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping.
Methods in Enzymol. 65, 718-749.

- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983). A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity.
Anal. Biochem. 132, 6-13.
- Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Min Jon, W., Molmans, F., Raemackers, A., Van den Berghe, A., Volckaert, G. & Ysebaert, M. (1976). Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA primary and secondary structure of the replicase gene.
Nature 260, 500-507.
- Finch, P.W., Brough, C.L. & Emmerson, P.T. (1986). Molecular cloning of *recA*-like gene of *Methylophilus methylotrophus* and identification of its product.
Gene 44, 47-53.
- Flensburg, J. & Steen, R. (1986). Nucleotide sequence analysis of the trimethoprim resistant dihydrofolate reductase encoded by R plasmid R751.
Nucl. Acids Res. 14, 5933.
- Foster, J.W. & Davis, R.H. (1966). A methane-dependent coccus, with notes on classification of obligate, methane utilizing bacteria.
J. Bacteriol. 91, 1924.
- Furlong, J.C. & Lilley, M.J. (1986). Highly selective chemical modification of cruciform loops by diethyl pyrocarbonate.
Nucl. Acids Res. 14, 3995-4007.
- Gabain, A., Belasco, J.G., Schottel, J.L., Chang, A.C.Y. & Cohen, S.N. (1983). Decay of mRNA in *Escherichia coli*: Investigation of the fate of specific segments of transcripts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 653-657.
- Gamas, P., Galas, D. & Chandler, M. (1985). DNA sequence at the end of IS1 required for transposition.
Nature 317, 458-460.
- Garen, A. (1968). Sense and nonsense in the genetic code.
Science 160, 149-159.
- Gheysen, D., Iserentant, D., Derom, C. & Fiers, W. (1982). Systematic alteration of the nucleotide sequence preceding the translational initiation codon and the effects on bacterial expression of the cloned SV 40 small t-antigen gene.
Gene 17, 55-63.
- Gicquel-Sanzey, B. & Cossart, P. (1982). Homologies between different procaryotic DNA-binding regulatory proteins and between their sites of action.
EMBO J. 5, 591-595.
- Gilbert, W., Majors, J. & Maxam, A. (1976). In: Organisation and Expression of Chromosomes. Allfrey, V.G. (ed). Dahlem Konferenz, Berlin, 167-172.

- Gill, R.E., Heffron, F., Dougan, G. & Falkow, S. (1978). Analysis of sequences transposed by complementation of two classes of transposition-deficient mutants of Tn3.
J. Bacteriol. 131, 742-746.
- Goff, S.A. & Goldberg, A.L. (1985). Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other genes.
Cell 41, 587-595.
- Gold, L., Pribnow, D., Schneider, T., Shinedling, S., Singer, B.S. & Stormo, G. (1981). Translation initiation in prokaryotes.
Ann. Rev. Microbiol. 35, 365-403.
- Grindley, N.D.F. & Reed, R.R. (1985). Transpositional Recombination in Prokaryotes.
Ann. Rev. Biochem. 54, 863-896.
- Gros, M.F. te Riele, H. & Ehrlich, S.D. (1987). Rolling circle replication of single-stranded DNA plasmid pC194.
EMBO J. 6, 3863-3869.
- Guarente, L., Roberts, T.M., Ptashne, M. (1980). Improved methods for maximizing expression of a cloned gene: A bacterium that synthesises rabbit β -globin.
Cell 20, 543-553.
- Haber, C.L., Allen, N.L., Zhao, S. & Hanson, R.S. (1983). Methylophilic Bacteria: Biochemical Diversity and Genetics.
Science 221, 1147-1153.
- Hanahan, D. & Meselson, M. (1980). Plasmid screening at high colony density.
Gene 10, 63-71.
- Hanson, E.B. & Yarmolinsky, M.B. (1986). Host participation in plasmid maintenance: Dependence upon *dnaA* of replicons derived from P1 and F.
Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 4423-4427.
- Hartley, J.L. & Donelson, J.E. (1980). Nucleotide sequence of the yeast plasmid.
Nature 286, 860-865.
- Hawley, D.K. & McClure, W.R. (1983). Compilation and Analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences.
Nucl. Acids Res. 11, 2237-2255.
- Hayashi, N.M. & Hayashi, M. (1985). Cloned DNA sequences that determine mRNA stability of bacteriophage ϕ X174 *in vivo* are functional.
Nucl. Acids Res. 13, 5983-5997.
- Hayes, W. (1953). Observation on a transmissible agent determining sexual differentiations in *Bact. coli*.
J. Gen. Microbiol. 8, 72-88.

- Heidecker, G. & Müller-Hill, B. (1977). Synthetic multifunctional proteins.
Mol. Gen. Genet. 155, 301-307.
- Heinrich, P. (1986). Guidelines for quick and simple Plasmid Sequencing.
Boehringer, Mannheim GmbH.
- Helmer-Citterich, M. Anceschi, M.M., Banner, D.W. & Cesarini, G. (1988). Control of ColE1 replication: low affinity specific binding of Rop (Rom) to RNAI and RNAII.
EMBO J. 7, 557-566.
- Hennam, J.F., Cunningham, A.E., Sharp, G.S. & Atherton, K.T. (1982). Expression of eukaryotic coding sequences in *Methylophilus methylotrophus*.
Nature 297, 80-82.
- Herbert, M., Kolb, A. & Buc, H. (1986). Overlapping promoters and their control in *Escherichia coli*: The *gal* case.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2807-2811.
- Higgins, I.J., Best, D.J., Hammond, R.C. & Scott, D. (1981). Methane-Oxidizing Microorganisms.
Microbiol. Reviews 45, 556-590.
- Hippel, P.H., Bear, D.G., Morgan, W.D. & McSwiggen, J.A. (1984). Protein-Nucleic Acid Interactions In Transcription: A Molecular Analysis.
Ann. Rev. Biochem. 53, 389-446.
- Ho, Y.S., Mahoney, M.E., Wulff, D.L. & Rosenberg, M. (1983). Bacteriophage protein cII binds promoters on the opposite face of the DNA helix from RNA polymerase.
Nature 304, 703-708.
- Ho, Y.S., Mahoney, M.E., Wulff, D.L. & Rosenberg, M. (1988). Identification of the DNA binding domain of the phage λ cII transcriptional activator and the direct correlation of cII protein stability with its oligomeric forms.
Genes & Development 2, 184-195.
- Hohenloser, W., Lingens, F. & Prëve, P. (1987). Characterization of a new methylotrophic strain, *Methylomonas clara*.
European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6, 167-179.
- Hollingshead, S. & Vapnek, D. (1985). Nucleotide Sequence Analysis of a Gene Encoding a Streptomycin/Spectinomycin Adenyltransferase.
Plasmid 13, 17-30.
- Hopwood, D.A., Malpartida, F., Kieser, H.M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B. A. M., Floss, H. G. & Omura, S. (1985). Production of hybrid antibiotics by genetic engineering.
Nature 314, 642-644.

- Hou, C. T. (1983) *Methylotrophs: Microbiology, Biochemistry, and Genetics*.
CRC Press Inc.
- Huang, C.J. & Heffron, F. (1986). Analysis of Tn3 sequences required for transposition and immunity.
Gene 41, 23-31.
- Humphreys, G.O., Willshaw, G.A. & Anderson, E.S. (1975). A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA.
Biochim. Biophys. Acta 383, 457-463.
- Ida, S., Meyer, J. & Arber, W. (1983). Movable Genetic Elements (ed Shapiro, J.)
159-221. (Academic, New York).
- Ida, S. & Hiestand-Nauer, R. (1986). Insertion element IS1 can generate a 10-base pair target duplication.
Gene 45, 233-235.
- Irani, M.H., Orosz, L. & Adhya, S. (1983). A Control Element within a Structural Gene: The *gal* Operon of *Escherichia coli*.
Cell 32, 783-788.
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, D., Heyneker, H.L., Bolivar, F. & Boyer, H.W. (1977). Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin.
Science 198, 1056-1093.
- Jacob, W.F., Santer, M. & Dahlberg, A.E. (1987). A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S rRNA of *Escherichia coli* affects translation of many proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4757-4761.
- Kahn, M., Kolter, R., Thomas, C., Figurski, D., Meyer, R., Remaut, E. & Helinski, D. R. (1979). Plasmid cloning vehicles derived from Plasmids ColE1, F, R6K and RK2.
Methods in Enzymology 68, 268-280.
- Kinashi, H. Shimaji, M. & Sakai, A. (1987). Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes.
Nature 328, 454-456.
- Kleckner, N. (1981). Transposable Elements in Prokaryotes.
Ann. Rev. Genet. 15, 341-404.
- Krämer, H., Amouyal, M., Nordheim, A. & Müller-Hill, B. (1988). DNA supercoiling changes the spacing requirement of two lac operators for DNA loop formation with lac repressor.
EMBO J. 7, 547-556.

- Kreft, J. & Hughes C. (1982). Cloning vectors derived from plasmids and phage of *Bacillus*.
Current Topics in Microbiol. and Immunol. 96, 1-17.
- Lacatena, R. M. & Cesarini, G. (1981). Base pairing of RNA I with its complementary sequence in the primer precursor inhibits ColE1 replication.
Nature 294, 623-626.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685.
- Landick, R. & Yanofsky, C., (1987). Isolation and Structural Analysis of the *Escherichia coli trp* Leader Paused Transcription Complex.
J. Mol. Biol. 196, 363-377.
- Lanka, E. & Barth, P.T. (1981). Plasmid RP4 specifies a deoxyribonucleic acid primase involved in its conjugal transfer and maintenance.
J. Bacteriol. 148, 769-781.
- Lederberg, J. (1952). Cell genetics and hereditary symbiosis.
Physiological Reviews 32, 403-430.
- Lederberg, J., Cavalli, L.L. & Lederberg, E. M. (1952). Sex compatibility in *E. coli*.
Genetics 37, 720-730.
- Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M.-A. & Böck, A. (1988) Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine.
Nature 331, 723-725.
- Leopold, P., Vailly, J., Cuzin, F. & Rassoulzadegan, M. (1987). Germ Line Maintenance of Plasmids in Transgenic Mice.
Cell 51, 885-886.
- Lewin, B. (1987). Genes III. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Lidstrom, M.E. & Wopat, A.E. (1984). Plasmids in methanotrophic bacteria: isolation, characterization and DNA hybridization analysis.
Arch. Microbiol. 140, 27-33.
- Little, J.W. & Mount, D.W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*.
Cell 29, 11-22.
- Livingston, D. M. (1977). Inheritance of 2 μ m DNA plasmid from *Saccharomyces*.
Genetics 86, 73-84.
- Looman, A.C., Bodlaender, J. Comstock, L.J., Eaton, D., Jhurani, P., de Boer, H.A. & van Knippenberg P.H. (1987). Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified lacZ gene in *Escherichia coli*.
EMBO J. 6, 2489-2492.

- Machlin, S.M., Tam, P.E., Bastien, C.A. & Hanson, R.S. (1988). Genetic and Physical Analysis of *Methylobacterium organophilum* XX Genes Encoding Methanol Oxidation.
J. Bacteriol. 179, 141-148.
- Mahillon, J. & Lereclus, D. (1988). Structural and functional analysis of Tn4430: identification of an integrase-like protein involved in the co-integrate-resolution process.
EMBO J. 7, 1515-1526.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Marmur, J., Rownd, R., Falkow, S., Baron, L.S., Schildkraut, C. & Doty, P. (1961). The nature of intergenic episomal infection.
Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 972-979.
- Marmur, J. (1961). A Procedure for the Isolation of Desoxyribonucleic Acid from Micro-Organisms.
J. Mol. Biol. 3, 208-218.
- Marquardt, R. (1983). Untersuchungen an Plasmiden aus den obligat methylotrophen Bakterienstämmen *Methylomonas clara* B45-BE-2 und B45-BE-3. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Marquardt, R., Wöhner, G. & Winnacker, E. L. (1984). Properties of plasmids from *Methylomonas clara*.
J. Biotechnology 1, 317-330.
- Martin, J. F. & Gil, J. A. (1984). Cloning and expression of antibiotic production genes.
Biotechnology 2, 63-72
- Masson, L. & Ray, D.S. (1986). Mechanism of autonomous control of the *Escherichia coli* F plasmid: different complexes of the initiator/repressor protein are bound to its operator and to an F plasmid replication origin.
Nucl. Acids Res. 14, 5693-5711.
- Masukata, H., Dasgupta, S. & Tomizawa, J. (1987). Transcriptional Activation of ColE1 DNA Synthesis by Displacement of the Non-transcribed Strand.
Cell 51, 1123-1130.
- McCarthy, J.E.G., Sebald, W., Gross, G. & Lammers, R. (1986). Enhancement of translational efficiency by the *Escherichia coli* *apE* translational initiation region: its fusion with two human genes.
Gene 41, 201-206.

- McMaster, G.K. & Carmichael, G.G. (1977). Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamid and agarose gels by using glyoxal and acridine orange.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4835.
- Meier, I. Wray, L.V. & Hillen, W. (1988). Differential regulation of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes *tetA* and *tetR* by the tandem *tet* operators O₁ and O₂.
EMBO J. 7, 567-572.
- Mertens, G., Klippel, A., Fuss, H., Blöcker, H., Frank, R. & Kahmann, R. (1988). Site-specific recombination in bacteriophage Mu: characterization of binding sites for the DNA invertase Gin.
EMBO J. 7, 1219-1227.
- Metzler, T. (1984). Untersuchungen an Plasmiden aus *Methylomonas clara*.
Diplomarbeit, Institut für Biochemie, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Misra, R. Shih, A. & Rush, M. (1987). Cloned Extrachromosomal Circular DNA Copies of the Human Transposable Element THE-1 are Related Predominantly to a Single Type of Family Member.
J. Mol. Biol. 196, 233-243.
- Monteiro, M.J., Typas, M.A., Mofett, B.F. & Bainbridge, B.W. (1982). Isolation and characterization of high molecular weight plasmid from the obligat methanol-utilizing bacterium *Methylomonas (Methanomonas) methylovora*.
FEMS Microbiol. Lett. 15, 235-239.
- Moore, T.A., Nayudu, M. & Holloway, B.W. (1983). Genetic mapping in *Methylophilus methylotrophus* AS1.
J. Gen. Micrbiol. 129, 785-799.
- Muesing, M. Tamm, J. Shepard, H.M. & Polisky, B. (1981). A single Base-Pair Alteration Is Responsible for the DNA Overproduction Phenotype of a Plasmid Copy-Number Mutant.
Cell 24, 235-242.
- Nester, W. J. & Kosuge, T. (1981). Plasmids specifying plant hyperplasias.
Ann. Rev. Microbiol. 35, 531-565.
- Newbury, S.F., Smith, N.H. & Higgins, C.F. (1987). Differential mRNA Stability Controls Relative Gene Expression within a Polycistronic Operon.
Cell 51, 1131-1143.
- Nilsson, G., Belasco, J.G., Cohen, S.N. & von Gabain, A. (1984). Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in *Escherichia coli*.
Nature 312, 75-77.

- Nordström, K., Molin, S. & Agaard-Hausen, H. (1980). Partitioning of plasmid R1 in *Escherichia coli* : I. Kinetics of lose of plasmid derivatives deleted of the *par* region.
Plasmid 4, 215-227.
- Novick, R., Clowes, R.C., Cohen, S. N., Curtiss, R.III., Datta, W. & Falkow, S. (1976). Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal.
Bact. Rev. 40, 168-169.
- Nunn, D.N. & Lidstrom, M.E. (1986a). Phenotypic Characterization of 10 Methanol Oxidation Mutant Classes in *Methylobacterium* sp. Strain AM1.
J. Bacteriol. 166, 591-597.
- Nunn, D.N. & Lidstrom, M.E. (1986b). Isolation and Complementation Analysis of 10 Methanol Oxidation Mutant Classes and Identification of the Methanol Dehydrogenase Structural Gene of *Methylobacterium* sp. Strain AM1.
J. Bacteriol. 166, 581-590.
- Ochiai, K., Yamanaka, T., Kimura, K. & Sawada, O. (1959). Studies on inheritance of drug resistance between *Shigella* strains and *Escherichia coli* strains.
Nippon Iji Shimpo 1861, 34-46.
- O'Halloran, T. & Walsh, C. (1987). Metalloregulatory DNA-Binding Protein Encoded by the *merR* Gene: Isolation and Characterization.
Science 235, 211-214.
- Okamoto, K. & Freundlich, M. (1986). Mechanism for the autogenous control of the *crp* operon: Transcriptional inhibition by a divergent RNA transcript.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5000-5004.
- Otsuka, A. & Abelson, J. (1978). The regulatory region of the biotin operon in *Escherichia coli* .
Nature 276, 689-694.
- Pabo, C.O. (1984). Protein-DNA Recognition.
Ann. Rev. Biochem. 53, 293-321.
- Pansegrau, W. & Lanka, E. (1987). Conservation of a common backbone in the genetic organization of the IncP plasmids RP4 and R751.
Nucl. Acids Res. 15, 2385.
- Peralta, E.G., Hellmiss, R., Ream, W. (1986). *Overdrive*, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumour-inducing plasmid.
EMBO J. 5, 1137-1142.
- Peschke, U., Beuck, V., Bujard, H., Gentz, R. & Le Grice, S. (1985). Efficient utilisation of *Escherichia coli* transcriptional signals in *Bacillus subtilis*.
J. Mol. Biol. 186, 547-555.

- Pines, O. & Inouye, M. (1986) Antisense RNA regulation in prokaryotes.
Trends in Genetics 11, 284-287.
- Präve, P., Sambeth, W., Sukatsch, D.a. (1975). Mikrobielle Eiweißgewinnung aus Kohlenhydraten.
Chemie in unserer Zeit 9, 59-64.
- Prentki, P., Chandler, M. & Galas, D.J. (1987). *Escherichia coli* integration host factor bends the DNA at the ends of IS1 and in an insertion hotspot with multiple IHF binding sites.
EMBO J. 6, 2479-2487.
- Pribnow, D. (1975). Bacteriophage T7 early promoters: Nucleotide sequence of two RNA polymerase binding sites.
J. Mol. Biol. 99, 419-443.
- Ptashne, M. (1978). In: Miller, J.H. & Reznikoff, W.S. (eds.). The Operon. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Ptashne, M. (1986). Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance.
Nature 322, 697-701..
- Quayle, J.R. & Ferenci, T. (1978). Evolutionary Aspects of Autotrophy.
Microbiol. Reviews 42, 251-273.
- Queen, C. & Korn, L.C. (1984). A comprehensive sequence analysis program for the IBM computer.
Nucl. Acids Res. 12, 581-599.
- Ramos, J.L. Wasserfallen, A. Rose, K. & Timmis, K.N. ((1987). Redesigning Metabolic Routes: Manipulation of TOL Plasmid Pathway for Catabolism of Alkylbenzoates.
Science 235, 593-596.
- Rauschel, B. (1984). Zur selektiven Transkription durch RNA Polymerase. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Reitzer, L. & Magasanik, B. (1985). Expression of *glnA* in *E. coli* is regulated at tandem promoters.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1979-1983.
- Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P. (1977). Labeling deoxy-ribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I.
J. Mol. Biol. 113, 237-251.
- Rosenberg, M. & Court, D. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription.
Ann. Rev. Genet. 13, 319-353.

- Sakanyan, V.A., Azaryan, N.G. & Krupenko, M.A., (1986). Molecular Organization of the plasmid R906 (Inc P-1).
Molekulyarnaya Biologiya, 19, 964-973; Plenum Publishing Corporation 1986.
- Scholten, P.M. & Nordheim, A. (1986). Diethyl pyrocarbonate: a chemical probe for DNA cruciforms.
Nucl. Acids Res. 14, 3981-3993.
- Sullivan, K.M. & Lilley, M.J. (1987). Influence of Cation Size and Charge on the Extrusion of a Salt-dependent Cruciform.
J. Mol. Biol. 193, 397-404.
- Sanger, F., Micklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.
- Schaller, H., Gray, C. & Herrmann, K. (1975). Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site from the DNA of bacteriophage fd.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 737-741.
- Scherer, G.F.E., Walkinshaw, M.D., Arnott, S. & Morre, D.J. (1980). The ribosome binding sites recognized by *E. coli* ribosomes have regions with signal character in both the leader and protein coding segments.
Nucl. Acids. Res. 8, 3895-3907.
- Seed, B. (1983). Purification of genomic sequences from bacteriophage libraries by recombination and selection *in vivo*.
Nucl. Acids Res. 11, 2427-2445.
- Shapiro, J. A. & Sporn, P. (1977). Tn402: a New Transposable Element Determining Trimethoprim Resistance That Inserts in Bacteriophage Lambda.
J. Bacteriol. 129, 1632-1635.
- Shapiro, J. A. , Ed. (1983) Mobile Genetic Elements. New York: Academic Press.
- Siebenlist, U., Simpson, R.B. & Gilbert, W. (1980). *E. coli* RNA Polymerase Interacts Homologously with Two Different Promoters.
Cell 20, 269-281.
- Simons, R.W. & Kleckner, N. (1983). Translational control of IS10 transposition.
Cell 34, 683-691.
- Shine, J. & Dalgarno, L. (1975). Determinants of cistron specificity in bacterial ribosomes.
Nature 254, 34-38.
- Smith, C.A. & Thomas, C.M. (1987). Comparison of the organisation of the genomes of phenotypically diverse plasmids of incompatibility group P: members of the IncP β sub-group are closely related.
Mol. Gen. Genet. 206, 419-427.

- Smith, M., Leung, D.W., Gillam, S., Astell, C.R., Montgomery, D.L. & Hall, B.D. (1979). Sequence of the gene for iso-1-cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*.
Cell 16, 753-761.
- Som, T. Armstrong, K. A., Volkert, F. C. & Broach, J. R. (1988). Autoregulation of 2 μ m Circle Gene Expression Provides a Model for Maintenance of Stable Plasmid Copy Levels.
Cell 52, 27-37.
- Söhngen, N.L. (1909). Über Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen.
Centr. Bakt. Parasitenk. 15, 513.
- Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98, 503-517.
- Stahl, U. & Esser, K. (1982). Plasmids in *Methylobionas clara*, a methylotrophic producer of single cell protein.
European J. Appl. Microbiol., 15, 223-226.
- Stenzel, T.T., Patel, P. & Bastia, D. (1987). The Integration Host Factor of *Escherichia coli* Binds to Bent DNA at the Origin of Replication of the Plasmid pSC101.
Cell 49, 709-717.
- Stern, D.B. & Grissem, W. (1987). Control of Plastid Gene Expression: 3' Inverted Repeats Act as mRNA Processing and Stabilizing Elements, but Do Not Terminate Transcription.
Cell 51, 1145-1157.
- Stormo, G.D., Schneider, T.D., and Gold, L.M. (1982). Characterization of translational initiation sites in *E. coli*.
Nucl. Acids. Res. 10, 2971-2995.
- Straney, D.C. & Crothers, D.M. (1987). A Stressed Intermediate in the Formation of stably Initiated RNA Chains at the *Escherichia coli* lac UV5 Promoter.
J. Mol. Biol. 193, 267-278.
- Stüber, D. & Bujard, H. (1981). Organization of transcriptional signals in plasmids pBR322 and pACYC184.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 167-171.
- Stüber, D. & Bujard, H. (1982). Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes.
EMBO J. 1, 1399-1404.

- Tait, R.C. & Boyer, H.W. (1978). On the nature of tetracycline resistance controlled by the plasmid pSC101.
Cell 13, 73-81.
- Takeda, Y., Ohlendorf, D.H., Anderson, W.F. & Matthews, B.W. DNA-Binding Proteins.
Science 221, 1020-1025.
- Taniguchi, T., Matusi, H., Iugita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. & Hamuro, J. (1983). Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2.
Nature 302, 305-310.
- Tatsurani, N. & Itoh, S. (1986). Enhancement of transcriptional activity of the *Escherichia coli trp* promotor by upstream A + T rich regions.
Gene 44, 29-36.
- Thauer, R.K. (1985). Nickelenzyme im Stoffwechsel methanogener Bakterien.
Biol. Chem.Hoppe-Seyler 366, 103-112.
- Thompson R.J. & Mosig, G. (1988) Integration host factor (IHF) represses a *Chlamydomonas* chloroplast promoter in *E. coli*.
Nucl. Acids Res. 16, 3313-3326.
- Timmis, K.N., Cabello, F., Andrés, I., Nordheim, A., Burkhardt, H.J. & Cohen, S.N. (1978). Instability of plasmid DNA sequences: macro and micro evolution of the antibiotic resistance plasmid R6-5.
Mol. Gen. Genet. 167, 11-19.
- Tinoko, Jr.I., Borer, P.N., Dengler, B., Levine, M.D., Uhlenbeck, O.C., Crothers, D.M & Gralla, J. (1973). Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acid.
Nature New Biology 246, 50-41.
- Tomizawa, J. (1984). Control of ColE1 plasmid replication: the process of binding of RNA I to the primer transcript.
Cell 38, 861-870.
- Valentin-Hansen, P., Hojrup, P. & Short, S. (1985). The primary structure of the DeoR repressor from *Escherichia coli* K-12.
Nucl. Acids Res. 13, 5927-5936.
- Valentin-Hansen, P., Albrechtsen, B. & Løve Larsen. (1986). DNA-protein recognition: demonstration of three genetically separated operator elements that are required for repression of the *Escherichia coli deoCABD* promoters by the DeoR repressor.
EMBO J. 8, 2015-2021.

- Veira, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19, 259-268.
- Vocke, C. & Bastia, D. (1985). The replication initiator protein of plasmid pSC101 is a transcriptional repressor of its own cistron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 2252-2256.
- Waddell, C.S. & Craig, N.L. (1988). Tn7 transposition: two transposition pathways directed by five Tn7-encoded genes. *Genes & Development* 2, 137-149.
- Wallace, R.B., Jokuson, M.J., Suggs, S.V., Miyaski, K., Bhatt, R. & Itakura, K. (1981). A set of synthetic oligodeoxyribonucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR322. *Gene* 16, 21-26.
- Ward, J.M. & Grinsted, J. (1982). Analysis of the Inc P-1 Group Plasmids R906 and R751 and Their Relationship to RP1. *Plasmid* 8, 244-252.
- Ward, J.M. & Grinsted, J. (1982). Physical and Genetic Analysis of the Inc-W Group Plasmids R388, S.a. and R7K. *Plasmid* 7, 239-250.
- Watanabe, T. (1963). Infectious heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bact. Rev.* 27, 87-115.
- Watanabe, T., Furuse, C., Sakaizumi, S. (1968). Transduction of various R factors by phage P1 in *Escherichia coli* and by phage P22 in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 96, 1791-1795.
- Weaver, R.F. & Weissmann, C. (1979). Mapping of RNA by a modification of the Berk-Sharp procedure: the 5'-termini of 15S β -Globin mRNA precursor and mature 10S β -Globin mRNA have identical map coordinates. *Nucl. Acids Res.* 7, 1175-1193.
- Whittenbury, R., Philipps, K.C., Wilkinson, J.F. (1970). Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61, 205-218.
- Whittenbury, R., Colby, J., Dalton, H. & Reed, H.C. (1976). Biology and ecology of methane oxidisers. In: H. G. Schlegel, G. Gottschalk, and Pfennig (ed), Symposium on microbial production and utilisation of gases (H₂, CH₄, CO), Göttingen. Akademie der Wissenschaften, Göttingen.

- Winberg, G. & Hammarskjöld, M.-L. (1980). Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper. Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA.
Nucl. Acids Res. 8, 253-264.
- Windass, J.D., Worsey, M.J., Pioli, E.M., Pioli, D., Barth, P.T., Atherton, K.T. & Dart, E.C. (1980). Improved conversion of methanol to single-cell protein by *Methylophilus methylotrophus*.
Nature 287, 396-401.
- Winnacker, E.-L. (1987). From Genes to Clones. Introduction to Gene Technology. Verlag Chemie, Weinheim.
- Wissmann, A., Meier, I., Wray, Jr. L.V., Geissendörfer, M. & Hillen, W. (1986). Tn10 tet operator mutations affecting Tet repressor recognition.
Nucl. Acids Res. 14, 4253-4266.
- Wong, H.C. & Chang, S. (1986). Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3233-3237.
- Yamamoto, T., Motegei, A., Takei, T., Okayama, H. & Sawai, T. (1984). Plasmid R46 provides a junction that promotes recA independent deletion, fusion and resolution of replicon.
Mol. Gen. Genet. 193, 255-262.
- Yanofsky, C. (1981). Attenuation in the control of expression of bacterial operons.
Nature 289, 751-758.
- Yanofsky, C., Platt, T., Crawford, I.P., Nichols, B.P., Christie, G.E., Horowitz, H., Van Cleemput, M. & Wu, A.M. (1981). The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *E. coli*.
Nucl. Acids Res. 9, 6647-6668.
- Zeikus, J.G., Kerby, R., & Krzycki, J.A. (1985). Single Carbon Chemistry of Acetogenic and Methanogenic Bacteria.
Science 227, 1167-1173.
- Zuber, P. & Losick, R. (1983). Use of a lacZ fusion to study the role of the spoO genes of *Bacillus subtilis* in developmental regulation.
Cell 35, 275-283.

Lebenslauf

Name	Thomas Metzler
Geburtsdatum	07. 09. 1958
Eltern	Franz Metzler Helga Metzler, geb. Gneißl
Familienstand	Ledig
1964 - 1969	Grundschule in Altdorf/Titting
1969 - 1978	Willibald-Gymnasium in Eichstätt (humanistisch-neusprachlich)
1978	Abitur
1978 -1983	Chemiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1981	Diplomvorprüfung
1983	Diplomhauptprüfung
03. 10. 1983 - 28. 9. 1984	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. E.-L. Winnacker am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians- Universität München (Thema: "Untersuchungen an Plasmiden aus <i>Methylomonas clara</i> ")
01. 11. 1984 - 07. 1988	Promotionsarbeit am selben Institut, ebenfalls unter Anleitung von Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Metzler, T., Marquardt, R., Präve, P. & Winnacker, E.-L. (1988). Characterisation of a promoter
from *Methylomonas clara*.
Mol. Gen. Genet. 211, 210-214.

